

# **Entwicklung und Synthese spaltbarer Linker für den Einsatz in der DNA- Sequenzierung und der Zellaufnahme von Antisense-Oligonukleotiden**



Dissertation  
zur Erlangung des  
Doktorgrades der Naturwissenschaften

vorgelegt beim Fachbereich Biochemie, Chemie und Pharmazie  
der Johann Wolfgang Goethe-Universität  
in Frankfurt am Main

von  
Diana Caterina Knapp  
aus Seeheim-Jugenheim

Frankfurt am Main, 2010

D30

vom Fachbereich Biochemie, Chemie und Pharmazie der

Johann Wolfgang Goethe - Universität als Dissertation angenommen.

Dekan: Prof. Dr. D. Steinhilber

Gutachter: Prof. Dr. J. W. Engels  
Prof. Dr. A. Heckel

Datum der Disputation: 25.10.2010

Die vorliegende Arbeit wurde unter der Leitung von Herrn Prof. Dr. J. W. Engels am Institut für Organische Chemie und Chemische Biologie der Johann Wolfgang Goethe-Universität in Frankfurt am Main in der Zeit von März 2006 bis Juni 2010 angefertigt.





***„Ich habe keine besondere Begabung, sondern bin nur leidenschaftlich neugierig.“***

(Albert Einstein)



## Danksagung

Ich danke Herrn *Prof. Dr. J. W. Engels* für die Möglichkeit, dass ich diese spannenden und besonders abwechslungsreichen Themen bearbeiten durfte. Ebenso möchte ich mich für die hervorragenden Arbeitsmöglichkeiten und für sein stets sehr großes Interesse am Fortgang der Arbeit, seine zahlreichen Anregungen und Ratschläge sowie die gleichzeitig gewährte akademische Freiheit bedanken.

*Herrn Prof. Dr. A. Heckel* danke ich für die Übernahme des Zweitgutachtens.

Mein besonderer Dank gilt *Dr. Jennifer D'Onofrio*, *Dr. Angelika Keller* und *Dr. Yangzhou Li* sowie den ArraySBS-Projektmitgliedern der kollaborierenden Firmen, *Prof. Dr. Ants Kurg* der Firma Asper Biotech, *Dr. Saulius Serva* und *Dr. Arvydas Lubys* von Fermentas UAB sowie *Prof. Dr. Mairo Remm* von der Universität in Tartu für dreieinhalb Jahre intensiver Zusammenarbeit im Rahmen des EU-Projekts „ArraySBS“. *Dr. Eugen Uhlmann* von Coley Pharmaceutical GmbH danke ich für die Zusammenarbeit im Rahmen der Zellaufnahme von Antisense-Oligonukleotiden. *Dr. Akihiro Ohkubo* vom Tokyo Institute of Technology danke ich für die Hilfe bei der Anwendung der von ihm entwickelten Oligonukleotidsynthese sowie die großzügige Bereitstellung von Material.

*Frau Illona Priess*, *Frau Hannelore Brill* und *Frau Ute Bahr* danke ich für die Aufnahme von unzähligen ESI- und MALDI- Massenspektren.

*Herrn Dr. Zimmermann*, *Herrn Dr. Richter* und *Herrn Olbrich* danke ich sehr für die Hilfe bzw. die Aufnahme von zahlreichen NMR Spektren.

*Frau Marianne Christoph* danke ich für die schnelle und zuverlässige Aufnahme von Elementaranalysen.

Ich danke außerdem allen nicht namentlich genannten Mitgliedern des Instituts bzw. des Fachbereichs 14, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Meinen Laborkollegen *Dr. Jennifer D'Onofrio*, *Dipl.-Chem. Christian Grünwald* und *Rainer Schmidt* danke ich für die äußerst angenehme Gestaltung des Laboralltags.

Ganz herzlich danke ich meinen Kollegen *Dr. Jennifer D'Onofrio, Dipl.-Chem. Lena Wicke, Dr. Angelika Keller, Dr. Jens Haas, Dipl.-Chem. Christian Grünewald, Dipl.-Chem. Alma Sokocevic* und *Dipl.-Chem. Olga Romainczyk* für die tolle Zusammenarbeit, die fachliche Unterstützung und Freundschaft sowie die vielen gemeinschaftlichen Unternehmungen.

Bei *Stefan Bernhardt* möchte ich mich für die ausgezeichnete Unterstützung bei der Arbeit an der HPLC und den Oligonukleotidsynthesen bedanken.

*Frau Ewa Rheinberger* danke ich für die stete Hilfsbereitschaft und die Zusammenarbeit bei der Erstellung der EU-Abrechnungen.

Allen nicht namentlich genannten, aktuellen und ehemaligen Arbeitskreismitgliedern danke ich für das angenehme Arbeitsklima.

Mein Dank gilt ferner der EU, Fermentas UAB und der Willkomm-Stiftung für die finanzielle Unterstützung.

Bei *Jennifer D'Onofrio* möchte ich mich besonders für die tolle Freundschaft, auch außerhalb des Labors, und ihre großartige Unterstützung bedanken.

Besonderer Dank gilt meiner *Familie* die mich stets bedingungslos in jeglicher Hinsicht unterstützt und an mich glaubt. Dabei möchte ich mich ganz besonders bei meinem Freund *Philipp* für seine großartige Unterstützung bei dieser Arbeit, sowohl als Partner, als auch als Chemiker bedanken.

# Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b><u>EINLEITUNG</u></b>	<b>1</b>
1.1	Oligonukleotide als pharmazeutische Wirkstoffe	2
1.2	DNA-Sequenzierung	4
<b>2</b>	<b><u>AUFGABENSTELLUNG</u></b>	<b>9</b>
<b>3</b>	<b><u>THEORETISCHER TEIL</u></b>	<b>11</b>
3.1	Linker – Ein Überblick	11
3.1.1	Fluorid-spaltbare Linker	12
3.1.2	Enzymatisch spaltbare Linker	15
3.2	Das Antisense-Konzept	18
3.2.1	Wirkmechanismen von Antisense-Oligonukleotiden	18
3.2.2	Chemische Modifikation von Antisense-Oligonukleotiden	20
3.3	Zellaufnahme von Oligonukleotiden	24
3.3.1	Zielgerichtete Aufnahme von Oligonukleotiden	26
3.3.2	Oligonukleotid-Prodrugs	30
3.4	Neue Generation der DNA-Sequenzierung	34
3.4.1	Pyrosequenzierung	34
3.4.2	Sequenzierung durch Ligation	38
3.4.3	Träger-gestützte Einzelmolekülsequenzierung durch Synthese	40
3.4.4	Träger-gestützte Sequenzierung durch Synthese mit reversiblen Terminatoren	45
3.4.4.1	Eigenschaften von DNA-Polymerasen	54
3.4.5	Detektion von genetischen Variationen durch Minisequenzierung	59
3.5	Das „ArraySBS“-EU Projekt	61
3.5.1	Bisherige Ergebnisse des Projekts	62
3.6	Verwendete Enzyme und Methoden	66
3.6.1	Eigenschaften der Penicillin G Acylase	66
3.6.2	Eigenschaften der Pyroglutamyl Aminopeptidase I	69
3.6.3	Schutzgruppenfreie Methode zur Synthese von Oligonukleotiden nach Sekine et al.	72
3.6.4	Synthese und Eigenschaften von 5'-Triphosphaten	75

<b><u>4</u></b>	<b><u>SAFETY-CATCH-LINKER FÜR ZIELGERICHTETE ZELL-AUFNAHME</u></b>	<b><u>79</u></b>
4.1	Design und Synthesestrategie des enzymatisch spaltbaren Safety-Catch-Linkers	79
4.2	Synthese der beiden mit Penicillin G Acylase spaltbaren Safety-Catch-Linker 81 und 82	84
4.2.1	Synthese des Amid-verknüpften Safety-Catch-Linkers 81	84
4.2.2	Synthese des Ester-verknüpften Safety-Catch-Linkers 82	88
4.3	Enzymspaltung der Linker 81 und 82	97
4.3.1	PGA-Spaltung des Amid-verknüpften Safety-Catch-Linkers 81	98
4.3.2	Stabilitäts- und Enzymspaltungsexperimente mit dem Ester-verknüpften Linker 82	101
4.4	Synthese eines Safety-Catch-Linkers für den Einsatz in Antisense-Experimenten	105
4.5	Stabilitäts- und Enzymspaltungsversuche mit dem PAP-I-spaltbaren Safety-Catch-Linker 111	107
4.5.1	Stabilitätsuntersuchung des Safety-Catch-Linkers 111	108
4.5.2	Mechanistische Untersuchung der nicht-enzymatischen Spaltung des Safety-Catch-Linkers 111	110
4.5.3	Enzymatische Spaltungsexperimente mit dem Ester-verknüpften Safety-Catch-Linker 111	112
4.6	Einbau des Safety-Catch-Linkers 111 in potentielle Antisense-Oligonukleotide	122
4.6.1	Präparative Vorbereitungen der Oligonukleotidsynthese	123
4.6.2	Synthese der Oligonukleotide nach <i>Ohkubo et al.</i>	129
<b><u>5</u></b>	<b><u>REVERSIBLE TERMINATOREN ZUR DNA-SEQUENZIERUNG</u></b>	<b><u>135</u></b>
5.1	Design und Synthesestrategie des Fluorid-spaltbaren Linkers	135
5.2	Synthese der Kernstruktur 143 des Fluorid-spaltbaren Linkers und der Modellverbindung 147	138
5.3	Spaltungseigenschaften und Spaltungsmechanismus der Modellverbindung 147	142
5.4	Synthese und Spaltungseigenschaften eines modifizierten Nukleosids	147
5.5	Synthese und Spaltung eines Fluorescein-markierten 8mer Oligonukleotids	154
5.6	Synthese der vier Fluoreszenz-markierten, reversiblen Terminatoren	162

5.6.1	Kupplung des Linkers an die vier 3'-O-CE-Nukleoside	164
<b>5.6.2</b>	<b><u>SYNTHESE DER TRIPHOSPHATE UND ANBINDUNG DES FLUORESZENZFARBSTOFFS</u></b>	<b>165</b>
5.6.2.1	Synthese des Fluorescein-markierten, reversiblen 2'-Desoxy-uridin Terminators <b>177</b>	167
5.6.2.2	Synthese des Cy3-markierten, reversiblen 2'-Desoxycytidin Terminator <b>178</b>	171
5.6.2.3	Synthese des Cy5-markierten, reversiblen 2'-Desoxy-guanosin Terminators <b>179</b>	175
5.6.2.4	Synthese des TexasRed-markierten, reversiblen 2'-Desoxy-adenosin Terminators <b>180</b>	180
<b>5.7</b>	<b>Polymeraseakzeptanz und erste Anwendung der vier reversiblen Terminatoren</b>	<b>185</b>
5.7.1	Inkorporationsversuche mit der reversen Transkriptase <i>RevertAid™ M-MuLV</i>	185
5.7.2	Erstes Anwendungsexperimente mit immobilisierten Hairpin-Templaten	187
<b>6</b>	<b><u>ZUSAMMENFASSUNG UND AUSBLICK</u></b>	<b>195</b>
<b>7</b>	<b><u>EXPERIMENTELLER TEIL</u></b>	<b>205</b>
<b>7.1</b>	<b>Allgemeine Informationen und Methoden</b>	<b>205</b>
7.1.1	Reinigung der Triphosphate und Oligonukleotide durch Ionenaustausch(IA) bzw. Umkehrphasen(RP)-Chromatographie an einem FPLC System	208
7.1.2	Reinigung der Triphosphate und Oligonukleotide durch IA- bzw. RP-HPLC und Analyse der Stabilitäts- und Spaltungstests durch analytische RP-HPLC	210
<b>7.2</b>	<b>Herstellung des Amid-verknüpften, enzymatisch spaltbaren Safety-Catch-Linkers <b>81</b></b>	<b>213</b>
7.2.1	Herstellung von 5'-O-Tosyl-2'-desoxythymidin <b>83</b>	213
7.2.2	Herstellung von 5'-Azido-2'-desoxythymidin <b>84</b>	214
7.2.3	Herstellung von 5'-Amino-2'-desoxythymidin <b>77</b>	215
7.2.4	Herstellung von Prop-2-ynyl-carbaminsäure- <i>tert</i> -butylester <b>89</b>	216
7.2.5	Herstellung von 4-Bromo-2-phthalimidomethylbenzoesäure <b>85</b>	217
7.2.6	Herstellung von 5'-Amino- <i>N</i> -(2-phthalimidomethyl-4-bromobenzamid)-2'-desoxythymidin <b>86</b>	218
7.2.7	Herstellung von 5'-Amino- <i>N</i> -(2-aminomethyl-4-bromobenzamid)-2'-desoxythymidin <b>87</b>	219
7.2.8	Herstellung von 5'-Amino- <i>N</i> -[2-(aminomethyl- <i>N</i> -phenylacetyl)-4-bromo-benzamid]-2'-desoxythymidin <b>88</b>	220

7.2.9	Herstellung von 5'-Amino- <i>N</i> -[2-(aminomethyl- <i>N</i> -phenylacetyl)-4-( <i>tert</i> -butoxycarbonylamino-prop-2-ynyl)benzamid]-2'-desoxythymidin <b>81</b>	221
<b>7.3</b>	<b>Herstellung der Ester-verknüpften, enzymatisch spaltbaren Safety-Catch-Linker 82 und 111</b>	<b>223</b>
7.3.1	Herstellung von 2-Chloromethyl-4-bromobenzoessäuremethylester <b>95</b>	223
7.3.2	Herstellung von 2-Azidomethyl-4-bromobenzoessäure <b>97</b>	224
7.3.3	Herstellung von 5'-(2-Azidomethyl-4-bromobenzoat)-2'-desoxythymidin <b>99</b>	226
7.3.4	Herstellung von 5'-[2-(Aminomethyl- <i>N</i> -phenylacetyl)-4-bromobenzoat]-2'-desoxythymidin <b>92</b>	227
7.3.5	Herstellung von 5'-Amino- <i>N</i> -[2-(aminomethyl- <i>N</i> -phenylacetyl)-4-( <i>tert</i> -butoxycarbonylamino-prop-2-ynyl)benzoat]-2'-desoxythymidin <b>82</b>	229
7.3.6	Herstellung von 5'-[2-(Aminomethyl- <i>N</i> -( <i>S</i> )-pyroglutamyl)-4-bromobenzoat]-2'-desoxythymidin <b>112</b>	231
7.3.7	Herstellung von 5'-Amino- <i>N</i> -[2-(aminomethyl- <i>N</i> -( <i>S</i> )-pyroglutamyl)-4-( <i>tert</i> -butoxycarbonylamino-prop-2-ynyl)benzoat]-2'-desoxythymidin <b>111</b>	233
7.3.8	Herstellung von 5-Bromo/5-Chloro-isoindolin-1-on <b>94</b>	234
7.3.9	Herstellung von 5-( <i>Tert</i> -butoxycarbonylamino-prop-2-ynyl)-isoindolin-1-on <b>107</b>	235
<b>7.4</b>	<b>Spaltungs- und Stabilitätsexperimente mit den Safety-Catch-Linkern 81, 82 und 111</b>	<b>236</b>
7.4.1	Enzymatische Spaltungsexperimente mit dem Amid-verknüpften Linker <b>81</b>	236
7.4.2	Spaltungs- und Stabilitätsexperimente mit dem Ester-verknüpften Linker <b>82</b> und Penicillin G <b>108</b>	237
7.4.3	Stabilitätsexperimente mit dem Ester-verknüpften Safety-Catch-Linker <b>111</b>	238
7.4.4	Mechanistische Untersuchung der spontanen Zyklisierung	241
7.4.5	Enzymatische Spaltungsexperimente mit dem Ester-verknüpften Linker <b>111</b> und Pyroglutamyl-4-nitroanilid <b>120</b>	241
7.4.5.1	Aufnahme der Kalibrierkurven für das Edukt <b>111</b> und das Produkt <b>107</b>	241
7.4.5.2	Durchführung der enzymatischen Spaltungsexperimente	243
<b>7.5</b>	<b>Synthese des Fluorid-spaltbaren Linkers 148 und der Modellverbindung 147</b>	<b>246</b>
7.5.1	Herstellung von 2-[2-(2-Azidoethoxy)ethoxy]ethanol <b>145</b>	246
7.5.2	Herstellung von 2-[2-[2-(2-Azidoethoxy)ethoxy]ethoxymethyl]oxirane <b>144</b>	247



7.5.3	Herstellung von 4-{2-[2-(2-Aminoethoxy)ethoxy]ethoxy}-3-hydroxybutyronitril <b>143</b>	248
7.5.4	Herstellung von Prop-2-ynyl-carbaminsäure-1-{2-[2-(2-azidoethoxy)ethoxy]ethoxymethyl}-2-cyanoethylester <b>148</b>	249
7.5.5	Herstellung von (3-Phenyl-prop-2-ynyl)carbaminsäure-1-{2-[2-(2-azidoethoxy)ethoxy]ethoxymethyl}-2-cyanoethylester <b>147</b>	250
7.5.6	Herstellung von 2,2,2-Trifluoro- <i>N</i> -(3-phenyl-prop-2-ynyl)-acetamid <b>197</b>	251
7.5.7	Herstellung von 3-Phenyl-prop-2-ynylamin <b>152</b>	252
7.5.8	Herstellung von ( <i>E/Z</i> )-4-{2-[2-(2-Azidoethoxy)ethoxy]ethoxy}-but-2-en-nitril <b>151</b>	253
7.5.9	Herstellung von (3-Phenyl-prop-2-ynyl)carbaminsäure-1-{2-[2-(2-aminoethoxy)ethoxy]ethoxymethyl}-2-cyanoethylester <b>156</b>	255
<b>7.6</b>	<b>Synthese der modifizierten Nukleoside 160 und 169</b>	<b>256</b>
7.6.1	Herstellung von 5-Iodo-5'- <i>O</i> -benzoyl-2'-desoxyuridin <b>155</b>	256
7.6.2	Herstellung von <i>N</i> <sup>3</sup> -Benzoyl-5-iodo-5'- <i>O</i> -benzoyl-2'-desoxyuridin <b>157</b>	257
7.6.3	Herstellung von 5-Iodo-3'- <i>O</i> -(2-cyanoethyl)2'-desoxyuridin <b>159</b>	258
7.6.4	Herstellung von 5-[(2,2,2-trifluoroacetylamino)ethinyl]-3'- <i>O</i> -(2-cyanoethyl)-2'-desoxyuridin <b>161</b>	259
7.6.5	Herstellung von 5-(3-Amino-prop-2-ynyl)-3'- <i>O</i> -(2-cyanoethyl)-2'-desoxyuridin <b>162</b>	260
7.6.6	Herstellung von Kohlensäure-1-{2-[2-(2-azidoethoxy)ethoxy]ethoxymethyl}-2-cyanoethylester-2,5-dioxo-pyrrolidin-1-ylester <b>163</b>	261
7.6.7	Herstellung von 5-(Prop-2-ynyl)carbaminsäure-1-{2-[2-(2-azidoethoxy)ethoxy]ethoxymethyl}-2-cyanoethylester]-3'- <i>O</i> -(2-cyanoethyl)-2'-desoxyuridin <b>160</b>	262
7.6.8	Herstellung von 5-[(2,2,2-Trifluoroacetylamino)ethinyl]-2'-desoxyuridin <b>198</b>	264
7.6.9	Herstellung von 5-(3-Amino-prop-2-ynyl)-2'-desoxyuridin <b>164</b>	265
7.6.10	Herstellung von (2-{2-[2-(3-Cyano-2-hydroxypropoxy)ethoxy]ethoxy}ethyl)carbaminsäure- <i>tert</i> -butylester <b>167</b>	266
7.6.11	Herstellung von Kohlensäure-1-{2-[2-(2- <i>tert</i> -butoxycarbonylaminoethoxy)ethoxy]ethoxymethyl}-2-cyanoethylester-2,5-dioxo-pyrrolidin-1-ylester <b>168</b>	267
7.6.12	Herstellung von 5-(Prop-2-ynyl)carbaminsäure-1-{2-[2-(2- <i>tert</i> -butoxycarbonylaminoethoxy)ethoxy]ethoxymethyl}-2-cyanoethylester]-3'- <i>O</i> -(2-cyanoethyl)-2'-desoxyuridin <b>169</b>	268
<b>7.7</b>	<b>Anbindung des Boc-geschützten Linkers 181 durch Sonogashira Kupplung</b>	<b>269</b>

7.7.1	Herstellung von Prop-2-ynyl-carbaminsäure-1-{2-[2-(2- <i>tert</i> -butoxycarbonylaminoethoxy)ethoxy]ethoxymethyl}-2-cyanoethylester <b>181</b>	269
7.7.2	AVV 1 – Sonogashira Kupplung des kompletten Linkers <b>181</b> an die 3'-modifizierten Nukleoside	270
7.7.3	Herstellung von 5-(Prop-2-ynyl)carbaminsäure-1-{2-[2-(2- <i>tert</i> -butoxycarbonylaminoethoxy)ethoxy]ethoxymethyl}-2-cyanoethylester-3'-O-(2-cyanoethyl)-2'-desoxyuridin <b>169</b>	271
7.7.4	Herstellung von 5-(Prop-2-ynyl)carbaminsäure-1-{2-[2-(2- <i>tert</i> -butoxycarbonylaminoethoxy)ethoxy]ethoxymethyl}-2-cyanoethylester-3'-O-(2-cyanoethyl)-2'-desoxycytidin <b>185</b>	272
7.7.5	Herstellung von 7-Deaza-7-(prop-2-ynyl)carbaminsäure-1-{2-[2-(2- <i>tert</i> -butoxycarbonylaminoethoxy)ethoxy]ethoxymethyl}-2-cyanoethylester-3'-O-(2-cyanoethyl)-2'-desoxyguanosin <b>186</b>	273
7.7.6	Herstellung von 7-Deaza-7-(prop-2-ynyl)carbaminsäure-1-{2-[2-(2- <i>tert</i> -butoxycarbonylaminoethoxy)ethoxy]ethoxymethyl}-2-cyanoethylester-3'-O-(2-cyanoethyl)-2'-desoxyadenosin <b>187</b>	274
<b>7.8</b>	<b>Herstellung der Fluoreszenz-markierten, reversiblen Terminatoren</b>	<b>275</b>
7.8.1	AVV 2 – Herstellung der Triphosphate mit freier Aminofunktion am Linker	275
7.8.2	Herstellung der 1 M Bis-(tri- <i>n</i> butylammonium)pyrophosphat Lösung	275
7.8.3	Herstellung von 5-(Prop-2-ynyl)carbaminsäure-1-{2-[2-(2-aminoethoxy)ethoxy]ethoxymethyl}-2-cyanoethylester-3'-O-(2-cyanoethyl)-2'-desoxyuridin 5'-Triphosphat <b>188</b>	276
7.8.4	Herstellung von 5-(Prop-2-ynyl)carbaminsäure-1-{2-[2-(2- <i>tert</i> -butoxycarbonylaminoethoxy)ethoxy]ethoxymethyl}-2-cyanoethylester-3'-O-(2-cyanoethyl)-2'-desoxycytidin 5'-Triphosphat <b>189</b>	277
7.8.5	Herstellung von 7-Deaza-7-(prop-2-ynyl)carbaminsäure-1-{2-[2-(2- <i>tert</i> -butoxycarbonylaminoethoxy)ethoxy]ethoxymethyl}-2-cyanoethylester-3'-O-(2-cyanoethyl)-2'-desoxyguanosin 5'-Triphosphat <b>190</b>	278
7.8.6	Herstellung von 7-Deaza-7-(prop-2-ynyl)carbaminsäure-1-{2-[2-(2- <i>tert</i> -butoxycarbonylaminoethoxy)ethoxy]ethoxymethyl}-2-cyanoethylester-3'-O-(2-cyanoethyl)-2'-desoxyadenosin 5'-Triphosphat <b>191</b>	279
7.8.7	Herstellung von 3'-O-CE-5'-O-Triphosphat-5-propargylaminocarbamat-4-(2-(2-(2- <i>N</i> -5(6)-carboxyfluoresceinaminoethoxy)ethoxy)ethoxy)butannitril-2'-desoxyuridin <b>177</b>	280
7.8.8	Herstellung von 3'-O-CE-5'-O-Triphosphat-5-propargylaminocarbamat-4-(2-(2-(2- <i>N</i> -Cy3-aminoethoxy)ethoxy)ethoxy)butannitril-2'-desoxycytidin <b>178</b>	282

7.8.9	Herstellung von 3'-O-CE-5'-O-Triphosphat-7-deaza-7-propargylaminocarbamat-4-(2-(2-(2- <i>N</i> -Cy5-aminoethoxy)ethoxy)ethoxy)butannitril-2'-desoxyguanosin <b>179</b>	283
7.8.10	Herstellung von 3'-O-CE-5'-O-Triphosphat-7-deaza-7-propargylaminocarbamat-4-(2-(2-(2- <i>N</i> -5(6)-carboxyTexasRed-aminoethoxy)ethoxy)ethoxy)butannitril-2'-desoxyadenosin <b>180</b>	284
<b>7.9</b>	<b>Spaltungsexperimente mit der Fluorid-spaltbaren Modellverbindung 147 und dem modifizierten Nukleosid 160</b>	<b>286</b>
<b>7.10</b>	<b>Oligonukleotidsynthesen</b>	<b>288</b>
7.10.1	Aufreinigung der Oligonukleotide und Bestimmung der Ausbeute	288
7.10.2	Schutzgruppenfreie Oligonukleotidsynthese	290
7.10.3	Herstellung der benötigten Reagenzien und Phosphoramidite für die schutzgruppenfreie Oligonukleotidsynthese	292
7.10.3.1	Herstellung von 5'-Amino- <i>N</i> -[2-(aminomethyl- <i>N</i> -( <i>S</i> )-pyroglutamyl)4-( <i>tert</i> -butoxycarbonylamino-prop-2-ynyl)-benzoat]-2'-desoxythymidin 3'-Phosphoramidit <b>125</b>	292
7.10.3.2	AVV 3 – Herstellung der entschützten Phosphoramidite	293
7.10.3.3	Herstellung von 3'-[(2-Cyanoethyl)-( <i>N,N</i> -diisopropyl)]-phosphoramidit-5'-(4,4-dimethoxytrityl)-2'-desoxycytidin <b>129</b>	293
7.10.3.4	Herstellung von 3'-[(2-Cyanoethyl)-( <i>N,N</i> -diisopropyl)]phosphoramidit-5'-(4,4-dimethoxytrityl)-2'-desoxyadenosin <b>130</b>	294
7.10.3.5	Herstellung von 3'-[(2-Cyanoethyl)-( <i>N,N</i> -diisopropyl)]phosphoramidit-5'-(4,4-dimethoxytrityl)-2'-desoxyguanosin <b>131</b>	295
7.10.3.6	Herstellung von 1-Hydroxy-6-nitrobenzotriazol (HO <sup>n</sup> Bt) <b>58</b>	296
7.10.3.7	Herstellung von Benzimidazolium Triflat (BIT) <b>54</b>	297
7.10.4	Herstellung der unmodifizierten Sequenz <b>122</b>	297
7.10.4.1	Herstellung der modifizierten Sequenz <b>141</b>	298
7.10.5	5'→3' Oligonukleotidsynthese	299
7.10.5.1	Herstellung von 5-(Prop-2-ynyl)carbaminsäure-1-{2-[2-(2-aminoethoxy)ethoxy]ethoxymethyl}-2-cyanoethylester-3'-O-(2-cyanoethyl)2'-desoxyuridin 5'-Phosphoramidit <b>170</b>	300
7.10.5.2	Herstellung des CPG-gebundenen, Fluorescein markierten Oligonukleotids <b>173</b>	301
7.10.5.3	Entschützung am Trägermaterial mit 1 M TBAF und Isolierung des entschützten Oligonukleotids <b>175</b>	302
<b>7.11</b>	<b>„Click“-Reaktionen an dem Fluorid-spaltbaren Linker 143</b>	<b>303</b>
7.11.1	Herstellung von 3-Hydroxy-4-(2-{2-[2-(4-phenyl-1,2,3-triazol-1-yl)ethoxy]ethoxy}ethoxy)butyronitril <b>195</b>	303
7.11.2	Herstellung von 3-Hydroxy-4-(2-{2-[2-(4-pyren-1-yl-1,2,3-triazol-1-yl)ethoxy]ethoxy}ethoxy)butyronitril <b>196</b>	304

<b><u>8</u></b>	<b><u>LITERATUR</u></b>	<b><u>307</u></b>
<b><u>9</u></b>	<b><u>ANHANG</u></b>	<b><u>329</u></b>
9.1	Publikationen, Poster und Vorträge	329
9.2	Lebenslauf	331
9.3	Eidesstattliche Erklärung	333

## Abkürzungsverzeichnis

#	Nummer (in Tabellen)
<b>A</b>	
abs.	absolut
ACN	Acetonitril
AIDS	Acquired Immune Deficiency Syndrome
APEX	Arrayed Primer Extension
ApoB-100	Apolipoprotein B-100
aq.	wässrig (aqueous)
Äq.	Äquivalent(e)
AS	Aminosäure
Asn	Asparagin
ATP	Adenosin-5'-triphosphat
<b>B</b>	
Bcl2	B-cell lymphoma 2
ber.	berechnet
BIT	Benzimidazolium Triflat
Boc	<i>tert</i> -Butoxycarbonyl
Boc <sub>2</sub> O	Di- <i>tert</i> -butyldicarbonat
BOP-Cl	Bis(2-oxo-3-oxazolidinyl)phosphansäurechlorid
bp	Basenpaare
br.	breit
BSA	Bovine Serum Albumin
Bz(Cl)	Benzoyl(chlorid)
<b>C</b>	
CCD	Charge Coupled Device
CE	2-Cyanoethyl
CEM	(2-Cyanoethoxy)methyl
CPG	Controlled Pore Glass
CPP	Cell Penetrating Peptide
<b>D</b>	
d	Dublett
dA	2'-Desoxyadenosin
dATP $\alpha$ S	2'-Desoxyadenosin-5'- $\alpha$ -thiotriphosphat
DBU	Diazabicycloundecen
DC	Dünnschichtchromatographie
dC	2'-Desoxycytidin
dCTP	2'-Desoxycytidin-5'-triphosphat
dd	Doppeldublett

ddATP	2',3'-Dideoxyadenosin-5'-triphosphat
ddCTP	2',3'-Dideoxycytidin-5'-triphosphat
ddd	dublettiertes Doppeldublett
DEAE	Diethylaminoethyl
dG	2'-Desoxyguanosin
dGTP	2'-Desoxyguanosin-5'-triphosphat
DIC	Diisopropylcarbodiimid
DMAP	<i>N,N</i> -Dimethyl-4-aminopyridin
DMF	Dimethylformamid
DMSO	Dimethylsulfoxid
DMTr	Dimethoxytrityl
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	2'-Desoxynukleosid-5'-triphosphat
DOPE	1,2-Dioleoyl- <i>sn</i> -glycero-3-phosphatidylethanolamin
DOTMA	<i>N</i> -[1-(2,3-Dioleoyloxy)propyl]- <i>N,N,N</i> -trimethylammoniumchlorid
dq	dublettiertes Quartett
DSC	Di-( <i>N</i> -Hydroxysuccinimidyl)carbonat
dt	dublettiertes Triplett
dT	2'-Desoxythymidin
DTM	Methyldithio- <i>tert</i> -butyl
dTMP	2'-Desoxythymidin-5'-monophosphat
DTT	Dithiothreitol
dTTP	2'-Desoxythymidin-5'-triphosphat
dUTP	2'-Desoxyuridin-5'-triphosphat
(d)XTP	(2'-Desoxy)ribonukleosid-5'-triphosphat
<b>E</b>	
EA	Elementaranalyse
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ESI	Elektrospray-Ionisation
<b>F</b>	
FDA	Federal Food and Drug Administration
FPLC <sup>®</sup>	Fast Protein Liquid Chromatography <sup>®</sup>
FRET	Fluoreszenz Energietransfer
FT-IR	Fouriertransformations-Infrarotspektroskopie
<b>G</b>	
gef.	gefunden
ges.	gesättigt
<b>H</b>	
h	Stunde
HCP	Highly Crosslinked (hochverzweigtes) Polystyrol

HCV	Hepatitis-C Virus
HGP	Human Genome Project
HOBt	1-Hydroxybenzotriazol
HO <sup>n</sup> Bt	1-Hydroxy-6-nitrobenzotriazol
HO <sup>Tr</sup> Bt	1-Hydroxy-6-triflylbenzotriazol
HPLC	High Performance Liquid Chromatography (Hochleistungsflüssigkeitschromatographie)
HR-MS	hochaufgelöste (High Resolution) Massenspektroskopie
<b>I</b>	
IA	Ionenaustausch
IUPAC	International Union of Pure and Applied Chemistry
<b>K</b>	
konz.	konzentriert
<b>L</b>	
LDL	Low Density Lipoprotein
LNA	Locked Nucleic Acid
Lsg.	Lösung
<b>M</b>	
m (IR)	medium
m (NMR)	Multiplett
MALDI	Matrix Assisted Laser Desorption Ionisation
Min	Minute
MMTr	Monomethoxytrityl
mRNA	messengerRNA
MS	Massenspektroskopie
MTM	Methylthiomethyl
MTX	Methotrexat
<b>N</b>	
n.b.	nicht bestimmt
<i>n</i> Hex	<i>n</i> Hexan
NHS	<i>N</i> -Hydroxysuccinimidyl
NMP	<i>N</i> -Methyl-2-pyrrolidon
NMR	nuclear magnetic resonance
nt	Nukleotid
NTCP	Na <sup>+</sup> /Taurocholate Cotransporting Polypeptide
Ntn	N-terminal nucleophile
Nuk	Nukleotid
<b>O</b>	
OD <sub>260</sub>	Optische Dichte bei 260 nm

## **P**

p.a.	pro analysi
PAP-I	Pyroglutamyl Aminopeptidase I
PCR	Polymerase Chain Reaction
PEG	Polyethylenglykol
PGA	Penicillin G Acylase
Phth	Phthaloyl
PNA	Peptide Nucleic Acid
PPi	Pyrophosphat
ppm	parts per million
PS	Polystyrol
PTMSEL	(2-Phenyl-2-trimethylsilyl)ethyl-Linker

## **Q**

q	Quartett
quant.	Quantitativ

## **R**

R <sub>F</sub>	Retentionsfaktor
RNA	Ribonukleinsäure
RNAi	RNA-Interferenz
RNase A	Ribonuklease A
RNase H	Ribonuklease H
RP	Reversed Phase (Umkehrphase)
RP-DC	Umkehrphasen-Dünnschichtchromatographie
RT	Raumtemperatur

## **S**

s (IR)	stark
s (NMR)	Singulett
SBS	Sequencing-by-Synthesis
Schmp.	Schmelzpunkt
Ser	Serin
SG	Schutzgruppe
Siedep.	Siedepunkt
siRNA	Small interfering RNA
SNP	Single Nucleotide Polymorphism
SOLID™	Supported Oligonucleotide Ligation and Detection
ssDNA	single strand DNA

## **T**

t	Triplett
TBAF	Tetrabutylammoniumfluorid
TCA	Trichloressigsäure

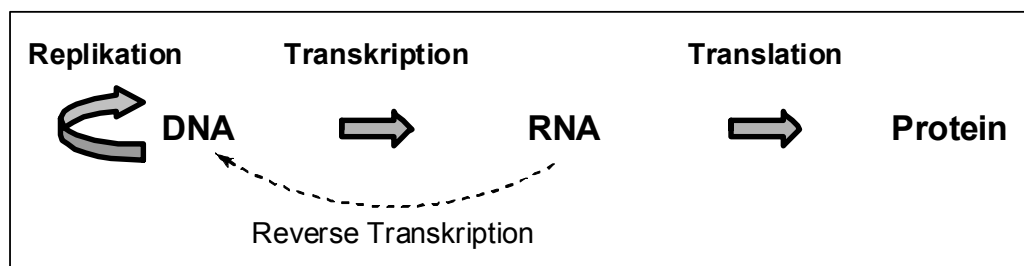


TCEP	Tris-(2-carboxyethyl)phosphan
TdT	Terminal Desoxynukleotidyl Transferase
TEAA	Triethylammoniumacetat
TEAB	Triethylammoniumbicarbonat
TFA	Trifluoressigsäure
THF	Tetrahydrofuran
TMS(Cl)	Trimethylsilyl(chlorid)
Tris(-Cl)	Tris(hydroxymethyl)aminomethan (Hydrochlorid)
TsCl	Tosylchlorid
<b>U</b>	
UV	Ultraviolett
U	Unit



# 1 Einleitung

Nukleinsäuren sind die zentralen Moleküle des Lebens und in der modernen Medizin aufgrund ihrer vielfältigen therapeutischen und diagnostischen Anwendungsmöglichkeiten von großer Bedeutung. Entscheidende Meilensteine auf dem Weg dorthin waren die Aufklärung der DNA-Doppelhelixstruktur durch *James Watson* und *Francis Crick* im Jahr 1953<sup>[1]</sup> und die Entschlüsselung der Aminosäuresequenz des Insulins durch *Frederick Sanger* im gleichen Jahr.<sup>[2,3]</sup> Aus diesen Entdeckungen resultierte wenig später die Erkenntnis, dass die Aminosäuresequenz eines Proteins genetisch bestimmt ist. Um die in der DNA gespeicherte Information nutzen zu können muss diese aber zunächst in RNA übersetzt werden (Transkription). Die daraus resultierende *messenger*-RNA (*mRNA*) wird dann aus dem Zellkern ausgeschleust und bindet im Zytoplasma an die Ribosomeinheit, was die Proteinbiosynthese (Translation) initiiert.<sup>[4]</sup> Die Übersetzung der mRNA in die Proteinsequenz erfolgt dabei durch die Erkennung von Basentriplets (Codon), die jeweils für eine der 20 proteinogenen Aminosäuren codieren.<sup>[5-7]</sup> Dieses Prinzip wurde von *Francis Crick* 1970 als „zentrales Dogma der Molekularbiologie“ bezeichnet<sup>[8]</sup> (Abbildung 1-1).



**Abbildung 1-1:** Schematische Darstellung des „zentralen Dogmas der Molekularbiologie“.

Dieses Prinzip gilt bis auf wenige Ausnahmen in allen Zellen. In seiner erweiterten Form berücksichtigt es auch die Replikation der DNA und die Funktion von Reversen Transkriptasen. Dieses Verständnis des biologischen Informationsflusses ermöglicht die Analyse phänotypischer Erscheinungen bis zu ihrem Ursprung im Genom und ist damit entscheidend für die Idee Oligonukleotide als Therapeutika einzusetzen. Vor allem die in den 1980er Jahren entwickelte automatisierte Festphasensynthese von Oligonukleotiden,<sup>[9-11]</sup> die einen einfachen synthetischen Zugang zu diesen Biomolekülen eröffnete, trug maßgeblich zu der Erforschung und Verwirklichung therapeutischer

peutischer Ansätze bei. Um das Potential dieser Ansätze ausschöpfen zu können ist ein tiefes Verständnis des hoch komplexen Zusammenhangs zwischen Gen und Phänotyp notwendig. Um das zu erreichen sind die Kenntnis der Nukleinsäuresequenz und somit Methoden zur DNA-Sequenzierung von zentraler Bedeutung.

## 1.1 Oligonukleotide als pharmazeutische Wirkstoffe

Die Wirkung der meisten, heute eingesetzten Therapeutika basiert auf der Wechselwirkung mit Proteinen wie Enzymen oder Rezeptoren, die mit der Krankheit in Zusammenhang stehen. Das heißt sie greifen erst auf der Stufe der Produkte der Biosynthese ein. Die Bildung dieser wichtigen Proteine wird aber auf der Ebene der Nukleinsäuren reguliert. Da diese Regulierung im Krankheitsfall oft entgleist liegen die Ursachen vieler Krankheiten wie Krebs, Diabetes oder viraler Infektionen in einer fehlerhaften Informationsübertragung. Es wäre daher wünschenswert Therapien bereits auf der Stufe der DNA oder RNA anzusetzen, um dieses Steuerungssystem gezielt zu modulieren.<sup>[12]</sup> Dieser Ansatz würde die Folgen der defekten genetischen Information, wie die Überexpression bestimmter Proteine oder die Synthese defekter Proteine unterbinden. Der Einsatz therapeutischer Oligonukleotide zur artifiziellen Regulation der Genexpression ist demnach ein vielversprechender Ansatz. Es haben sich verschiedene Strategien auf allen Stufen der Genexpression (siehe Abbildung 1-1) etabliert. So wirkt das Triplehelix(Antigen)-Konzept bereits auf der Stufe der DNA, Aptamere hingegen können sowohl an Oligonukleotidstrukturen, als auch an Proteine binden. Die meisten Strategien wie die Ribozyme, der RNAi-Mechanismus und der Antisense-Ansatz greifen auf der Stufe der mRNA ein.

Das Antisense-Konzept ist der älteste Ansatz zur Nutzung von Oligonukleotiden als artifizielle Genexpressionsregulatoren. Antisense-Oligonukleotide besitzen meist eine Länge von 15 bis 20 Nukleotiden und binden über Watson-Crick-Basenpaarung an ihre komplementäre mRNA. Es wurde erstmals im Jahr 1978 von *Zamecnik* und *Stephenson* am Beispiel der Inhibierung des *Rous sarcoma-Virus* verwirklicht.<sup>[13]</sup> Heute werden Antisense-Oligonukleotide prinzipiell in zwei Gebieten erfolgreich eingesetzt. Das erste ist die Grundlagenforschung im Bereich funktioneller Genomik, wo sie zur Aufklärung der Funktion von Genen im Menschen aber auch in anderen Organismen beitragen.<sup>[14]</sup>

Ein für die Wirkstoffforschung wichtiger Aspekt ist dabei die Validierung von Zielen. Antisense-Oligonukleotide stellen dabei eine viel einfachere, zuverlässigere und günstigere Alternative zu beispielsweise „knockout“ Tieren dar.<sup>[15]</sup> Das zweite große Gebiet ist natürlich die Anwendung von Antisense-Oligonukleotiden als therapeutische Wirkstoffe. Das erste Medikament auf Antisense-Basis ist *Vitravene*<sup>®</sup> (Formvirsen, Isis Pharmaceuticals), das 1998 von der FDA zur Behandlung von cytomegaloviraler Retinitis bei AIDS Patienten zugelassen wurde.<sup>[16]</sup> Diese erste Zulassung eines Medikaments, basierend auf dieser neuen therapeutischen Strategie war ein erster großer Erfolg. Es folgten sehr viele klinische Studien mit Antisense-Oligonukleotiden hauptsächlich in den Indikationsbereichen Onkologie, virale Infektionen und Autoimmunkrankheiten.<sup>[17]</sup> Einige Wirkstoffe befinden sich bereits in der klinischen Phase III. Das sind beispielsweise der ApoB-100-Hemmer *Mipomersen* (Genzyme) zur Senkung des LDL-Cholesterinspiegels,<sup>[18]</sup> *Alicaforsen* (Atlantic Healthcare) für die Behandlung von Colitis ulcerosa,<sup>[19]</sup> oder *Affinitak* (Isis Pharmaceuticals) für den Einsatz bei nicht-kleinzelligen Lungenkarzinoma.<sup>[20]</sup>

Trotz zahlreicher Beispiele für therapeutische Oligonukleotide in klinischen Phasen bleiben die Erfolge in Form von zugelassenen Medikamenten bis jetzt hinter den Erwartungen zurück. Alle Oligonukleotid-Ansätze haben mit einigen vergleichbaren Schwierigkeiten wie nukleolytischem Abbau, Toxizität und „off-target“ Effekten durch zu geringe Selektivität zu kämpfen. Aufgrund ihrer polyanionischen Natur ist ein weiterer kritischer Punkt ihre geringe Zellaufnahme. Die Aufnahme von Oligonukleotiden hängt von einer Reihe von Faktoren wie der Temperatur,<sup>[21]</sup> der Konzentration,<sup>[21,22]</sup> der Länge des Oligonukleotids<sup>[23]</sup> und der Zelllinie ab. Für gezielte *in vivo* Anwendungen sind natürlich einige dieser Faktoren wie Temperatur oder Zelltyp nicht mehr variabel. Man konzentriert sich hier hauptsächlich auf die Modifikation der Oligonukleotide selbst bzw. den Einsatz geeigneter Transfektionshilfsstoffe. Die Unterschiede zwischen Ergebnissen aus Zellkulturen und aus *in vivo* Studien sind allerdings relativ groß. Beispielsweise sind in Zellkulturen in der Regel Hilfsstoffe wie kationische Lipide für einen effektiven Transport in die Zelle notwendig. *In vivo* hingegen ist es auch möglich, modifizierte Oligonukleotide ohne zusätzliche Hilfsstoffe erfolgreich einzusetzen. Bei dem zugelassenen Medikament *Vitravene*<sup>®</sup> wird der Einsatz „nackter“ Antisense-Oligonukleotide durch die direkte Applikation in den

Glaskörper des Auges erreicht. Größere Probleme bereitet in diesem Zusammenhang die systemische Administration, da eine schnelle Entfernung aus dem Blut durch nukleolytischen Abbau, die Niere und das retikuloendotheliale System erfolgt. Daher sind hier kontinuierliche, intravenöse Gaben notwendig, um die Konzentration des Wirkstoffs aufrecht zu erhalten.<sup>[24,25]</sup> Die Zellaufnahme im Allgemeinen und vor allem die zielgerichtete Aufnahme am gewünschten Wirkort stellen daher immer noch einen Engpass in der Anwendung von therapeutischen Oligonukleotiden dar. Die Untersuchung und das Auffinden geeigneter Modifikationen und Hilfsstoffe sind daher unerlässlich für den weiteren Erfolg von Antisense- oder RNAi-Therapeutika.

Für die zielgerichtete Aufnahme von Wirkstoffen ist die Konjugation mit einem spezifischen Transportermolekül ein vielversprechender Ansatz. Auch für Oligonukleotide wurde diese Strategie bereits erfolgreich angewendet.<sup>[25-30]</sup> Die angebundenen Liganden können allerdings auch unerwünschte Nebeneffekte hervorrufen wie die unspezifische Bindung an Zellbestandteile<sup>[31]</sup> oder die schnelle Ausschleusung aus der Zelle.<sup>[26-28]</sup> Das kann trotz verbesserter Aufnahme zu einer Reduktion des verfügbaren Wirkstoffs führen. Es ist daher wünschenswert, die Derivatisierung durch Verwendung eines spaltbaren Linkers reversibel zu machen. Da es sich um Anwendungen unter physiologischen Bedingungen handelt, erscheint die Verwendung eines enzymatisch spaltbaren Linkers vorteilhaft. Das ermöglicht außerdem die gezielte Freisetzung im gewünschten Gewebe, indem man das Design eines solchen Linkers so gestaltet, dass er von einem spezifischen Enzym am Wirkort gespalten wird.

## 1.2 DNA-Sequenzierung

Die ersten Methoden zur Sequenzierung von DNA wurden 1977 von *Allan Maxam* und *Walter Gilbert*<sup>[32]</sup> bzw. von *Frederick Sanger et al.*<sup>[33]</sup> publiziert.

Die Maxam-Gilbert Methode basiert auf einem chemischen Abbau der DNA mit basenspezifischen Reagenzien. Dabei werden vier parallele Reaktionsansätze durchgeführt. Durch die statistische Spaltung der <sup>32</sup>P-markierten DNA werden Bruchstücke erzeugt, die dann gelelektrophoretisch aufgetrennt werden. Die Sequenz ist direkt aus dem Radiogramm der vier basenspezifischen Ansätze ablesbar.

Die Methode ist stark durch die Länge der zu sequenzierenden DNA begrenzt, sie sollte 750 Basenpaare (bp) nicht übersteigen. Es konnten mit der Maxam-Gilbert Methode dennoch einige Erfolge, wie beispielsweise die Sequenzierung des Genoms des Bakteriophagen T7 im Jahr 1983 erzielt werden.<sup>[34]</sup> Vor allem im Bezug auf Weiterentwicklung und Automatisierung konnte sie sich jedoch nicht gegen die im Folgenden vorgestellt Sanger Sequenzierung durchsetzen.

Die Sanger Methode nutzt die DNA-Polymerasereaktion aus. Sie basiert demnach auf dem enzymatischen Aufbau eines komplementären Strangs der zu analysierenden DNA-Sequenz. Der Kern dieser Methode ist die Verwendung von 2',3'-Didesoxynukleotiden als Terminierungsreagenzien. Nach dem Einbau einer 2',3'-Didesoxynukleotids wird die Polymerasereaktion abgebrochen. Die statistischen Bruchstücke werden dann mittels Gelelektrophorese getrennt, um daraus die Sequenz abzulesen. Ursprünglich wurden ebenfalls vier Reaktionsansätze mit <sup>32</sup>P-markierten Primern durchgeführt und jedem Ansatz eines der vier 2',3'-Didesoxynukleotide als Terminierungsreagenz zugesetzt. So gelang die Sequenzierung des 5000 Nukleobasen großen  $\phi$ X174 Bakteriophagen Genoms, wofür *Frederick Sanger* 1980 den Nobelpreis erhielt.<sup>[35]</sup>

Die Sanger Methode ist im Vergleich zur Maxam-Gilbert Methode schneller, genauer und ermöglicht die Sequenzierung längerer DNA-Stücke (die Standard-Templatlänge beträgt 1000 bp). Sie wurde außerdem mit großem Erfolg stetig weiterentwickelt. Ein erster wichtiger Schritt zur Vereinfachung und Beschleunigung der Methode war die Verwendung von Fluoreszenzfarbstoffen anstatt der radioaktiven Markierung.<sup>[36]</sup> Durchgesetzt hat sich dabei die Verwendung von Fluoreszenz-markierten 2',3'-Dideoxyterminatoren im Gegensatz zu beispielsweise Fluoreszenz-markierten Primern. Dies ermöglicht eine Eintopf-Polymerasereaktion mit allen vier Terminatoren anstatt der vier parallelen Reaktionen mit jeweils einem Terminator. Weitere Verbesserungen des Verfahrens brachten die Entwicklung der parallelisierten Kapillarelektrophorese und die weitestgehende Automatisierung.<sup>[37-41]</sup>

Die rasante Entwicklung der Sanger Methode war seit 1990 vor allem durch das größte Sequenzierungsprojekt, das *Human Genome Project (HGP)*, getrieben. Das von der US Regierung finanzierte Projekt startete 1990 und das Ziel war die Sequenzierung des kompletten menschlichen Genoms (3,069,431,456 bp) innerhalb von 15 Jahren. Pro Jahr wurde dazu 200 Millionen US Dollar zur Verfügung gestellt, das ergibt eine

geplante Gesamtinvestition von 3 Milliarden US Dollar. Universitäten und Forschungszentren aus neun Ländern (USA, UK, Japan, Frankreich, Deutschland, China, Indien, Kanada und Neuseeland) waren an den Sequenzierungsarbeiten beteiligt. Parallel dazu wurde durch die *Celera Corporation* ein „Konkurrenzprojekt“ zur Sequenzierung des humanen Genoms durchgeführt. Die ersten Veröffentlichungen der Ergebnisse aus beiden Projekten erfolgten gleichzeitig im Februar 2001 durch *Eric Lander et al.* in *Nature* (Regierungsprojekt)<sup>[42]</sup> und *Craig Venter et al.* in *Science* (Celera Projekt).<sup>[43]</sup> Die endgültige Komplettierung erfolgte 2003. Die Sequenzierung des menschlichen Genoms dauerte also 13 Jahre und kostete fast 3 Milliarden US Dollar.<sup>[44]</sup>

Dieser Meilenstein war allerdings nur der Anfang. Die Ergebnisse des HGP stellen ein Referenzgenom dar, das neue Fragen, Ziele und Hoffnungen für die standardmäßige Anwendung der DNA-Sequenzierung in einer ganzen Reihe von Gebieten weckte.<sup>[45-47]</sup> Der Fokus liegt dabei deutlich auf den medizinischen und biologischen Anwendungsmöglichkeiten. Das wohl ehrgeizigste Ziel ist die „personalisierte Medizin“. Zu ihrer Realisierung ist ein tiefes Verständnis des Zusammenhangs zwischen den genetischen Merkmalen des Individuums und beispielsweise Risiken für Krankheiten oder Nebenwirkungen von Pharmaka notwendig. Der einzige Weg dieses Verständnis zu erlangen ist die Analyse menschlicher Genome. Dabei ist sowohl die Sequenzierung gesamter Genome oder krankheitsrelevanter Teilstücke wichtig, als auch die Katalogisierung von Sequenzvariationen wie *single nucleotide polymorphisms* (SNPs). Besonders interessant sind dabei die seltenen Variationen mit einer Häufigkeit von < 5 %, die mit den bis dahin existierenden Methoden nicht oder nur durch Zufall entdeckt werden konnten.<sup>[48]</sup> Weitere Bereiche sind die Untersuchung von epigenetischen Veränderungen (Methylierungsmuster), die RNA-(Transkriptom-)Analyse und die Sequenzierung von mikrobiellen und viralen Genomen, um die Mutation von Viren und die Resistenzbildung von Bakterien zu verfolgen. Alle diese Informationen würden das Verständnis, die Diagnose sowie die Behandlung und Prävention von Krankheiten nachhaltig beeinflussen. Durch die daraus resultierenden neuen diagnostischen Möglichkeiten wäre sogar die personalisierte Behandlung unter Berücksichtigung von individuellen Risiken und Vorteilen in Zukunft möglich.

Die aus diesen Zielen entstandenen Anforderungen bezüglich Kosten, Effizienz und Geschwindigkeit der Sequenzierung sind mit der Sanger Methode nicht erfüllbar. Der



Hauptgrund dafür ist die zeit- und kostenintensive gelelektrophoretische Analyse. Geht man beispielsweise von einer durchschnittlichen Leselänge von 1000 Basenpaaren aus, so würde die Sequenzierung eines Genoms (3 Milliarden Basenpaare) mindestens 3 Millionen Sequenzierungsschritte erfordern. Berücksichtigt man noch die zusätzliche Sequenzierung überlappender Sequenzen und das Resequenzieren zur Fehlerreduktion, so steigt die Zahl der Sequenzierungsschritte schnell auf viele Millionen. Das ist auch mit der mittlerweile sehr stark parallelisierten und automatisierten Sanger Methode nicht zu akzeptablen Kosten und in der erforderlichen Geschwindigkeit für eine standardmäßige Anwendung machbar. Der daraus resultierende Bedarf an neuen Sequenzierungsmethoden und das im Jahr 2004 von dem amerikanischen *National Human Genome Research Institute (NHGRI)* ausgegebene Ziel des „\$ 1000“-Genoms bis zum Jahr 2015,<sup>[49,50]</sup> führten in den letzten fünf bis zehn Jahren zu einer rasanten Entwicklung neuartiger Technologien. Einige davon werden bereits in einer neuen Generation von DNA-Sequenzierern vermarktet. Trotz dieser ersten Erfolge ist der Weg zu einer verlässlichen klinischen Anwendung noch lang.<sup>[51,52]</sup> Die Forschung auf dem Gebiet der DNA-Sequenzierung wird daher nach wie vor mit großer Geschwindigkeit vorangetrieben.

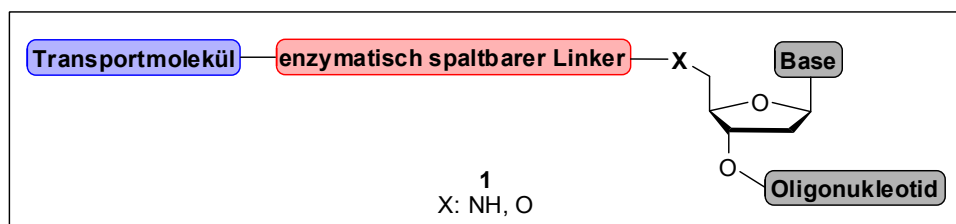


## 2 Aufgabenstellung

Das Ziel dieser Arbeit war die Entwicklung und Synthese von zwei spaltbaren Linkern. Dabei wurden zwei unterschiedliche Themengebiete bearbeitet:

- 1) Entwicklung eines enzymatisch spaltbaren Safety-Catch-Linkers, der eine flexible Modifizierung ermöglicht für den potentiellen Einsatz zur ziel-gerichteten Zellaufnahme von (Antisense-)Oligonukleotiden.
- 2) Entwicklung eines Fluorid-spaltbaren Linkers für die reversible Fluoreszenzmarkierung von Triphosphaten zum Einsatz in einer neuen Methode der DNA-Sequenzierung.

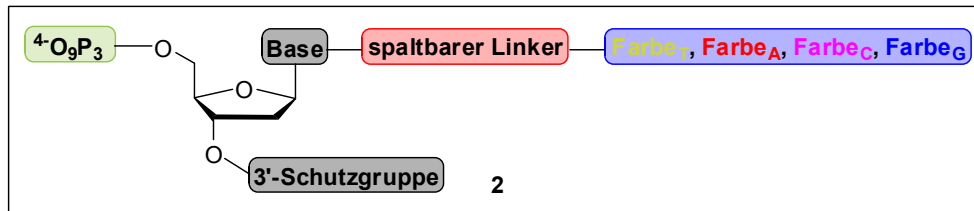
In Abbildung 2-1 ist die allgemeine Zielstruktur für den enzymatisch spaltbaren, Transporter-modifizierten Linker **1** dargestellt.



**Abbildung 2-1:** Allgemeine Zielstruktur des enzymatisch spaltbaren, Transporter-modifizierten Linkers **1**.

Der enzymatisch spaltbare Linker sollte leicht bezüglich der enzymatischen Substratgruppe und des Transporters variierbar sein. Diese Anforderung musste beim Design des Linkers beachtet werden. Nach der erfolgreichen Synthese sollten Substrate für verschiedene Enzyme eingebaut und ihre Spaltungsbedingungen untersucht werden. Weiterhin sollte die Stabilität des spaltbaren Linkers Gegenstand intensiver Analyse sein. Durch die Synthese eines Linker-modifizierten Phosphoramidits sollte außerdem der Einbau in ein Oligonukleotid und die postsynthetische Modifizierung mit einem Transportermolekül gezeigt werden.

Die Entwicklung des Fluorid-spaltbaren Linkers zur Synthese reversibler Terminatoren fand im Rahmen des EU-Projekts „ArraySBS“ statt. In Abbildung 2-2 ist die allgemeine Struktur eines reversiblen Terminators **2** gezeigt.



**Abbildung 2-2:** Allgemeine Struktur eines reversiblen Terminators **2**.

Eine Hauptanforderung an reversible Terminatoren ist die Spaltbarkeit der 3'-Schutzgruppe und des Linkers unter den gleichen Bedingungen. Da eine Fluorid-spaltbare 3'-Schutzgruppe verwendet wurde ergab sich für den Linker, der im Rahmen dieser Arbeit entwickelt werden sollte, das Ziel der effizienten Fluoridspaltbarkeit. Nach der erfolgreichen Synthese sollten die Spaltungsbedingungen evaluiert und die vier Fluoreszenz-markierten, reversiblen Terminatoren in sehr hoher Reinheit synthetisiert werden. Anschließend sollten sie durch die Partnerfirmen *Fermentas UAB* aus Litauen und *Asper Biotech* aus Estland bezüglich ihrer Eignung als Substrate für die DNA-Polymerase und ihrer terminierenden Eigenschaften evaluiert werden. Darüber hinaus war ein erster Anwendungstest der entwickelten, reversiblen Terminatoren an immobilisierten DNA-Templaten geplant.

# 3 Theoretischer Teil

## 3.1 Linker – Ein Überblick

Die offizielle Definition nach IUPAC der Bezeichnung „Linker“ beschreibt diesen als *„Bifunctional chemical moiety attaching a compound to a solid support or soluble support which can be cleaved to release compounds from the support. A careful choice of linker allows cleavage to be performed under appropriate conditions compatible with the stability of the compound and assay method.“*<sup>[53]</sup> Das bedeutet, dass laut der Definition die Eigenschaft „spaltbar“ in dem Wort „Linker“ bereits enthalten ist. Des Weiteren ist der Linker der Teil des Harzes der zur funktionellen Spaltung benötigt wird. Der Teil zwischen dem Linker und dem Harz wird als „Spacer“ bezeichnet.<sup>[54]</sup>

Der größte Anwendungsbereich von Linkern ist die Festphasensynthese. Initiiert durch die erste Publikation einer Peptid-Festphasensynthese von *Bruce Merrifield* 1963<sup>[55]</sup> wurden zunächst hauptsächlich Peptide und Oligonukleotide<sup>[9,56,57]</sup> durch Festphasengestützte Synthese hergestellt. In den frühen 1990er Jahren wurde dann die Festphasentechnologie für die Synthese kleiner, organischer Moleküle und zur Entwicklung von neuen Medikamenten entdeckt. Seither wurde eine Vielzahl von Linkern entwickelt, deren vollständige Aufzählung den Rahmen dieser Arbeit übersteigen würde. Neben verschiedenen Übersichtsartikeln<sup>[58-62]</sup> geben auch Kapitel aus den folgenden zwei Büchern einen guten Überblick: *Highlights in Bioorganic Chemistry: Methods and Application*, Kapitel 6.1<sup>[54]</sup> und *Drug Discovery Strategy and Methods*, Kapitel 7.<sup>[63]</sup>

Weitere wichtige Anwendungen von Linkern sind die reversible Fluoreszenzmarkierung von Oligonukleotiden<sup>[64,65]</sup> z. B. für den Einsatz in der DNA-Sequenzierung (siehe Kapitel 3.4) und die Anwendung, von oft enzymatisch spaltbaren Linkern, in Prodrugs<sup>[66-71]</sup> (siehe Kapitel 3.3.2).

Zunächst sollen an dieser Stelle die unterschiedlichen Spaltungsmethoden etwas näher beleuchtet werden. In Tabelle 3-1 sind einige Linkerfamilien und ihre Spaltungsbedingungen zusammengefasst.

**Tabelle 3-1:** Spaltungsmethoden verschiedener Linkerfamilien.<sup>[a][54]</sup>

Spaltungsreagenz	Benzyl- Linker	Ketal- / Acetal- Linker	Ester- / Amid- Linker	Silyl- Linker	Triazen- Linker	Selen- / Schwefel- / Zinn-Linker
Elektrophile	++	++	++	++	++	++
Nukleophile	0	0	++	0	0	0
Fluoridionen	0	0	0	++	0	0
Licht (hν)	(++)	0	0	0	+	0
Oxidierende Bedingungen	0	0	0	0	0/+	++
Reduzierende Bedingungen	0	0	+	0	0/+	++

<sup>[a]</sup> ++: Spaltung, (++): speziell entwickelter Linker, +: teilweise Spaltung, 0: keine Spaltung.

Wie Tabelle 3-1 zeigt sind alle großen Linkerfamilien mit Elektrophilen spaltbar. Elektrophile sind hier fast ausschließlich Protonen aus Säuren wie Trifluoressigsäure (TFA) und Hydrogenfluorid (HF).<sup>[54]</sup> Ansonsten ist eine gute Orthogonalität zwischen den unterschiedlichen Gruppen zu erkennen. Nicht aufgeführt sind hier enzymatisch spaltbare Linker, da sie sich nur schwierig in einer strukturellen Gruppe zusammenfassen lassen.

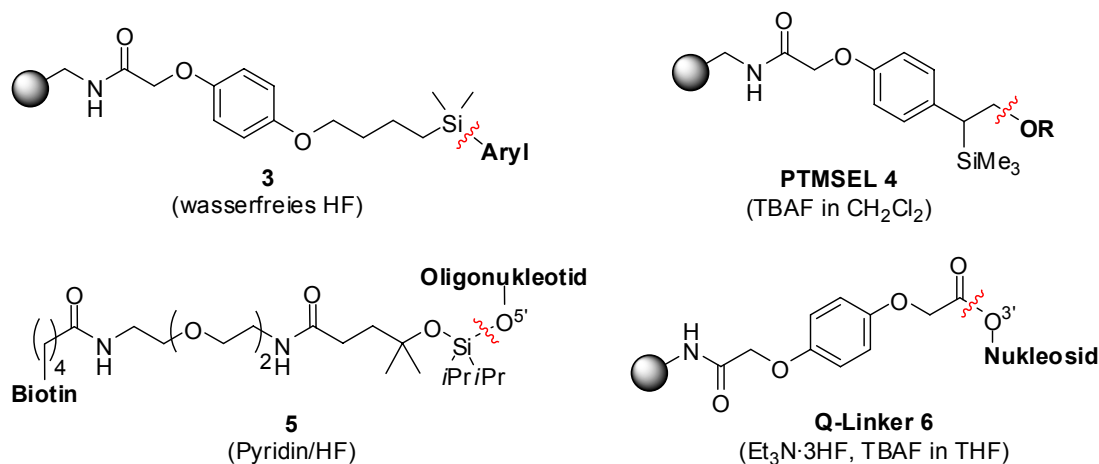
Da im Rahmen dieser Arbeit ein Fluorid-spaltbarer und ein enzymatisch spaltbarer Linker entwickelt wurden, wird in den folgenden Kapiteln auf diese beiden Gruppen näher eingegangen.

### 3.1.1 Fluorid-spaltbare Linker

Fluoridspaltbarkeit ist im Bezug auf Orthogonalität eine sehr nützliche Eigenschaft. Das zeigt auch die große Beliebtheit von Silyl-Schutzgruppen in der organischen Synthese. Fast alle Fluorid-spaltbaren Linker basieren auf Siliziumorganylen und die meisten werden ebenfalls in der Festphasensynthese eingesetzt. Dort haben sich Silyl-Linker vor allem aufgrund ihrer Eigenschaft als „traceless Linker“<sup>ci</sup> (Linkertyp, der keinen Rest an dem Zielmolekül hinterlässt) für Arene bewährt.<sup>[72]</sup> Einen Überblick über die Vielfalt der Silizium-basierten Linker für die Festphasen-gestützte Synthese organischer Moleküle geben ebenfalls die oben genannten Artikel<sup>[58,60,62]</sup> und Buchkapitel.<sup>[54,63]</sup> Ein sehr ausführliches Kapitel findet sich in dem Übersichtsartikel von *Guillier et al.*<sup>[60]</sup> Als

<sup>i</sup> IUPAC Definition: Type of linker which leaves no residue on the compound after cleavage.<sup>[53]</sup>

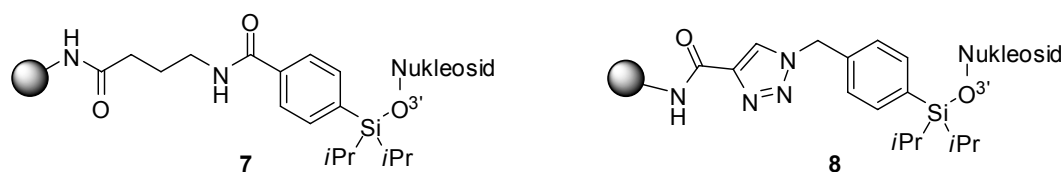
Fluoridquellen werden hauptsächlich die bekannten Reagenzien Tetrabutylammoniumfluorid (TBAF) und Hydrogenfluorid (HF) eingesetzt. Es gibt aber auch Beispiele, bei denen  $\text{CsF}$ <sup>[73-75]</sup> oder TBAF Analoga wie Benzyltrimethylammonium Hydrogendifluorid (BTAHF)<sup>[76]</sup> als Reagenzien zum Einsatz kommen. Viele der Silyl-Linker sind ebenfalls durch Säure wie TFA spaltbar (siehe Tabelle 3-1). Fluorid-spaltbare Linker, die gleichzeitig säurestabil sind, sind demnach selten. In Abbildung 3-1 sind einige Beispiele Fluorid-spaltbarer Linker unter Angabe der entsprechenden Spaltungsreagenzien aufgezeigt.



**Abbildung 3-1:** Beispiele Fluorid-spaltbarer Linker mit Spaltungsbedingungen.

Der Silyl-basierte Linker **3** ist ein rückstandsloser (traceless) Linker für die Festphasensynthese und wird für die Anbindung von Arenen genutzt. Ein Beispiel ist die Synthese von Diazepinen.<sup>[72]</sup> Der von *Wagner et al.* entwickelte (2-Phenyl-2-trimethylsilyl)ethyl-Linker (PTMSEL) **4** wird zur Festphasen-gestützten Synthese von Peptiden und Glykopeptiden eingesetzt und ist unter nahezu neutralen Bedingungen (TBAF in Dichlormethan) spaltbar.<sup>[77-79]</sup> Der Linker **5** wird nicht in der Festphasen-gestützten Synthese, sondern zur Affinitätsaufreinigung von Oligonukleotiden eingesetzt. Dabei wird die Bindung von Biotin an immobilisiertes *NeutrAvidin*<sup>TM</sup> ausgenutzt.<sup>[80]</sup> Ein anderes Beispiel ist ein von *Kwiatkowski et al.* entwickelter Disiloxy-Linker (nicht abgebildet), der die postsynthetische Entfernung von depurinierten Anteilen in Oligonukleotiden ohne die gleichzeitige Abspaltung von der festen Phase ermöglicht.<sup>[81]</sup> Auch in der Festphasen-gestützten Synthese von Oligonukleotiden haben sich Fluorid-spaltbare Linker zur Einführung von basenlabilen Gruppen etabliert. Nukleotide mit basenlabilen Gruppen, wie beispielsweise das in RNA natürlich

vorkommende 4-*N*-Acetylcytidin oder das entsprechende 4-*N*-Acetyl-2'-*O*-methylderivat,<sup>[82]</sup> sind interessante Bausteine für Stabilitätsuntersuchungen von RNA-Duplexen.<sup>[83]</sup> Auch spielen basenlabile Modifikationen eine große Rolle in Prodrugansätzen und für eine verbesserte Zellaufnahme von Oligonukleotiden.<sup>[84]</sup> Ein etabliertes Beispiel ist der in Abbildung 3-1 gezeigte *Q-Linker* **6**.<sup>[85,86]</sup> Er ist eines der wenigen Beispiele für einen säurestabilen, nicht Siliziumorganyl-basierten, Fluorid-spaltbaren Linker. Zusätzlich zu seiner Fluoridspaltbarkeit ist er unter sehr milden, basischen Bedingungen spaltbar und wurde beispielsweise erfolgreiche zur Synthese 2'-*O*-Pivaloyloxymethyl modifizierter Oligonukleotide eingesetzt.<sup>[86]</sup> Von *Ohkubo et al.* wurde eine neue, schutzgruppenfreie Synthesemethode für Oligonukleotide gefunden (siehe Kapitel 3.6.3).<sup>[87]</sup> In diesem Zusammenhang wurden auch zwei Silyl-basierte, Fluorid-spaltbare Linker **7**<sup>[88]</sup> und **8**<sup>[89]</sup> entwickelt (Abbildung 3-2).



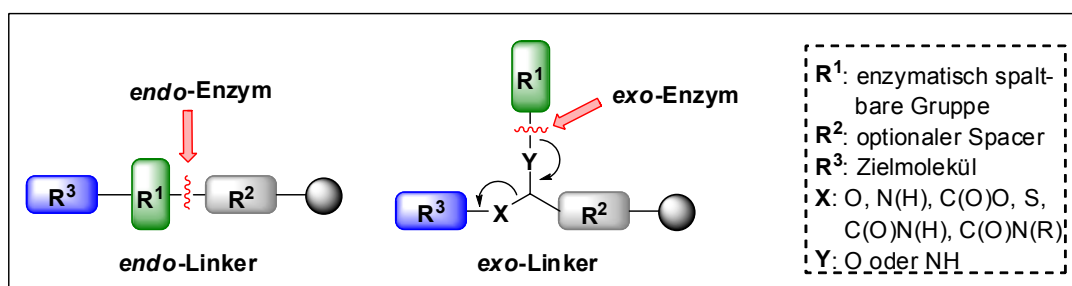
**Abbildung 3-2:** Die beiden von *Ohkubo et al.* entwickelten Silyl-Linker **7**<sup>[88]</sup> und **8**.<sup>[89]</sup>

Linker **7** wird über eine Amid Bindung an ein Amino-modifiziertes Polymer gebunden, der andere Linker **8** über eine „Click“-Reaktion an ein Acetylen-modifiziertes Polymer. Zusammen mit der neu entwickelten Synthesemethode ermöglichen diese Linker **7** und **8** die Synthese von Oligonukleotiden mit basenlabilen Modifikationen ohne den Gebrauch von Schutzgruppen an den Baseneinheiten.



### 3.1.2 Enzymatisch spaltbare Linker

Enzymatische Reaktionen zeichnen sich durch eine hohe Selektivität und milde Bedingungen ( $\text{pH} = 5 - 8$ ,  $25 - 37^\circ\text{C}$ ) aus. Neben dem Einsatz von enzymatischen Reaktionen in der Schutzgruppen-<sup>[90,91]</sup> und in der präparativen Chemie<sup>[92-95]</sup> sind auch enzymatisch spaltbare Linker ein wichtiges Anwendungsgebiet. Solche Linker werden in der Festphasen-gestützten Synthese und zur Herstellung von reversiblen Konjugaten, vor allem für Prodrugansätze eingesetzt. Enzymatisch spaltbare Linker, die in der Festphasensynthese eingesetzt werden, sind in einigen Übersichtsartikeln zusammengefasst.<sup>[61,96-98]</sup> Sie werden entsprechend dem verwendeten Enzym in *exo*- und *endo*-Linker eingeteilt (Abbildung 3-3).<sup>[96]</sup>

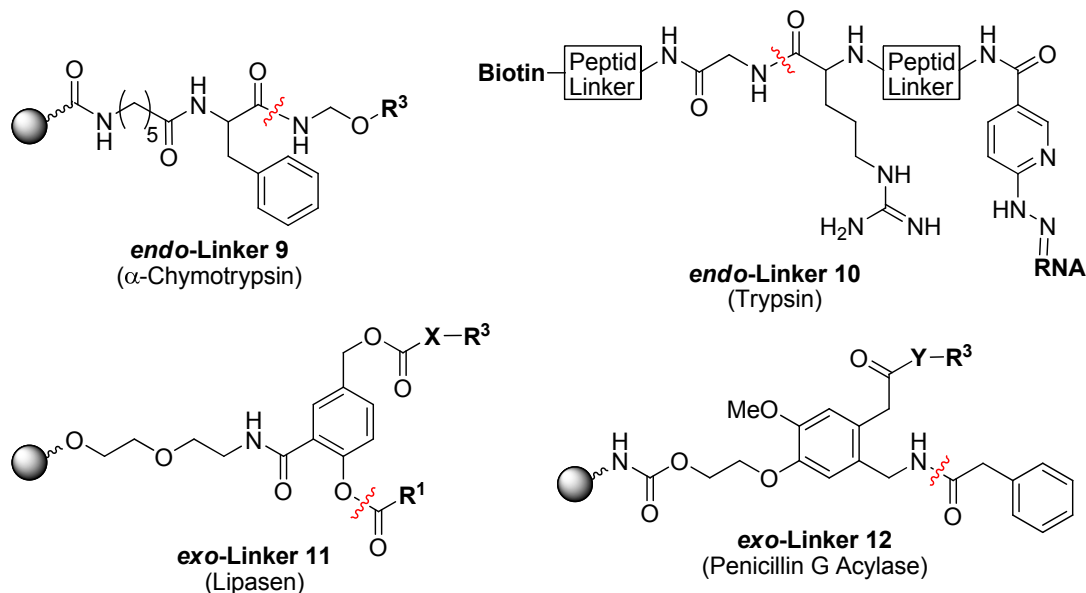


**Abbildung 3-3:** Schematische Darstellung des Aufbaus von *exo*- bzw. *endo*-Linkern.<sup>[96]</sup>

Beide Linkertypen bestehen aus drei Teilen: (1) einer Gruppe, die von einem Enzym erkannt und hydrolysiert wird ( $\text{R}^1$ ); (2) einer Anbindungsstelle für das Zielmolekül ( $\text{R}^3$ ) und (3) einem optionalen Spacer ( $\text{R}^2$ ). Bei *endo*-Linkern sind diese drei Teile linear angeordnet, so dass die Freisetzung des Zielmoleküls direkt mit der enzymatisch katalysierten Hydrolyse erfolgt. Oft ist das Zielmolekül anschließend noch mit der Erkennungsgruppe für das Enzym funktionalisiert. Bekannte Beispiele für *endo*-Enzyme sind Trypsin,<sup>[99,100]</sup> Chymotrypsin,<sup>[101,102]</sup> Subtilisin,<sup>[103]</sup> Phosphodiesterasen<sup>[104]</sup> und RNase A.<sup>[105]</sup> Die Spaltung von *exo*-Linkern beruht ebenfalls auf der Erkennung und Hydrolyse einer spezifischen Gruppe durch das Enzym. Allerdings erfolgt die Freisetzung des Zielmoleküls erst nach einer durch die Hydrolyse induzierten, intramolekularen Umlagerung oder Cyclisierung. Das Zielmolekül behält keine Funktionalität des Linkers zurück. *Exo*-Linker können also als „traceless Linker“ bezeichnet werden. Beispiele für *exo*-Enzyme sind die sehr oft verwendete Penicillin G Acylase (PGA)<sup>[106-110]</sup> und weitere Amidasen sowie Lipasen.<sup>[111]</sup> PGA

hydrolysiert Phenylacetamide,<sup>[106-108]</sup> -ester<sup>[112]</sup> und -hydrazide<sup>[109]</sup> und ist kommerziell erhältlich.

In der nachfolgenden Abbildung 3-4 sind einige Beispiele von enzymatisch spaltbaren Linkern mit Angabe der spaltenden Enzyme gezeigt.

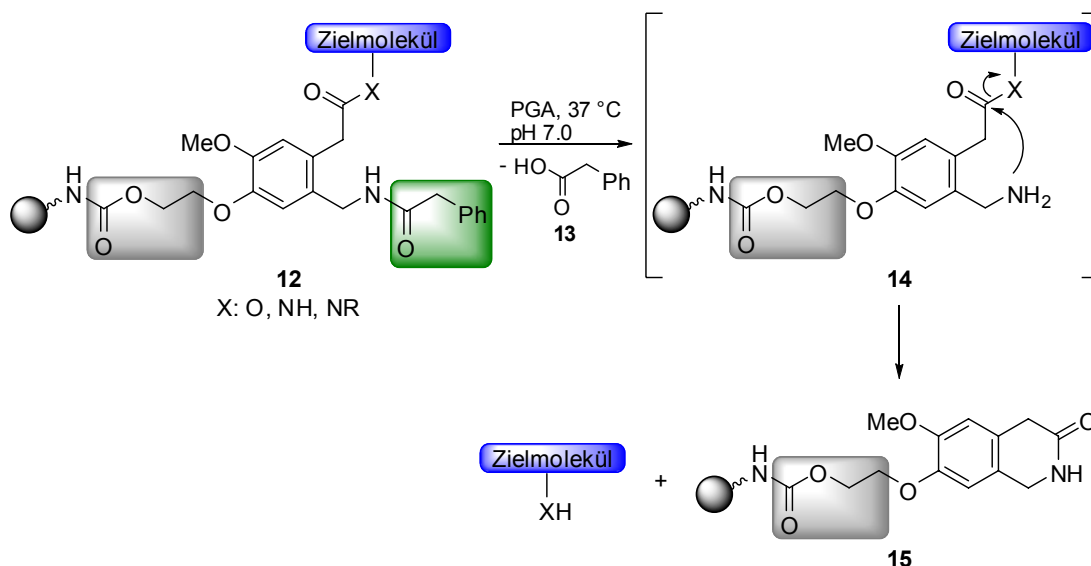


$R^3$ : Zielmolekül;  $R^1$ : enzymatisch spaltbare Gruppe; X: O, NH,  $CR_2$ ; Y: O, NH, NR

**Abbildung 3-4:** Beispiele enzymatisch spaltbarer *endo*- und *exo*-Linker, die spaltenden Enzyme sind in Klammern angegeben.

Der *endo*-Linker **9** kann mit  $\alpha$ -Chymotrypsin gespalten werden und wird zur enzymatischen Festphasensynthese von Oligosacchariden eingesetzt.<sup>[101,102]</sup> Der Trypsin-spaltbare *endo*-Linker **10** ist ein Beispiel für die Verwendung eines enzymatisch spaltbaren Linkers außerhalb der Festphasensynthese. Hier wird ein Aldehyd modifiziertes Ribonukleosid in ein Oligomer eingebaut und anschließend mit dem 6-Hydrazin-nicotinsäure- und Biotin-funktionalisierten Linker gekuppelt. In der angegebenen Literaturstelle wird die Affinitätsaufreinigung mit Agarose-immobilisiertem Streptavidin beschrieben.<sup>[100]</sup> Die beiden *exo*-Linker **11** und **12** sind zur Anwendung in der organischen Synthese von kleinen Molekülen entwickelt worden. Dabei wurde der Lipase-spaltbare Linker **11** bisher erfolgreich zum Aufbau von Heterozyklen mittels der Pictet-Spengler Reaktion eingesetzt.<sup>[111]</sup> Wesentlich mehr Beispiele für erfolgreiche Synthesen sind für den gezeigten, PGA-spaltbaren Linker **12** von Grether *et al.* publiziert. Er wurde bereits in Palladium-katalysierten C-C-Kuppelungen, Mitsunobu und Diels-Alder Reaktionen sowie 1,3-dipolaren Zykladditionen

eingesetzt.<sup>[107,108]</sup> Es handelt sich bei diesem Linker, ebenso wie bei dem Linker **11**, um einen so genannten *Safety-Catch-Linker*<sup>ii</sup>. Bei dem Safety-Catch-Linker **12** wird das Zielmolekül nach erfolgter Hydrolyse durch eine intramolekulare Cyclisierung freigesetzt. In Schema 3-1 sind die einzelnen Schritte des Spaltungsmechanismus nachvollzogen.



**Schema 3-1:** Prinzip des Penicillin G Acylase-spaltbaren Linkers **12**.<sup>[108]</sup> In blau ist das Zielmolekül markiert, in grün die enzymatische Erkennungsgruppe und in grau der Spacer

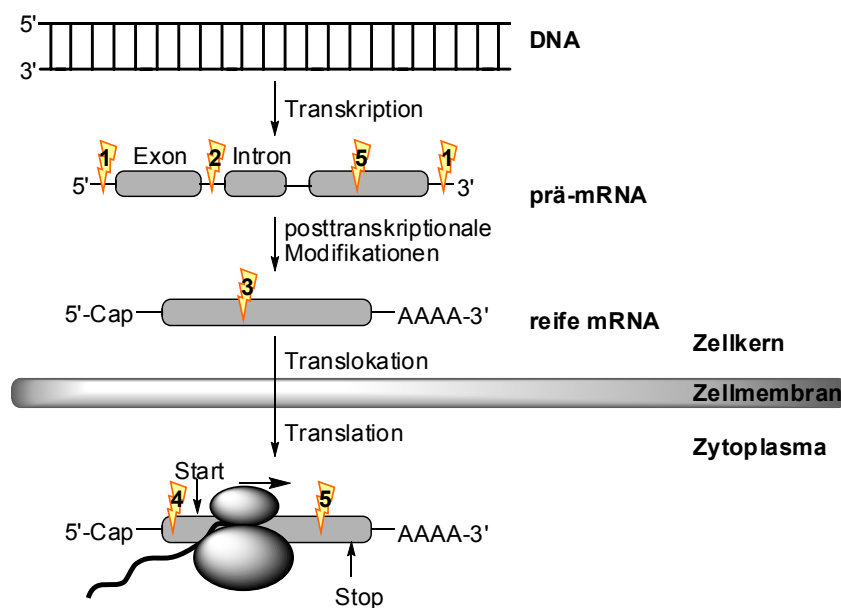
Die Farbcodierung entspricht der in Abbildung 3-3, in blau ist demnach das Zielmolekül unterlegt, in grün die enzymatisch spaltbare Gruppe und in grau der Spacer. Entsprechend dem Safety-Catch-Prinzip erfolgt die Spaltung in zwei Schritten. Als erstes wird die Phenylacetylgruppe durch die Penicillin G Acylase bei pH = 7.0 und 37 °C hydrolytisch abgespalten. Es entsteht das reaktive Benzylamin **14**, das zu dem stabilen Lactam **15** zyklisiert und dabei das Zielmolekül freisetzt.

<sup>ii</sup> IUPAC Definition: A linker which is cleaved by performing two different reactions instead of the normal single step, thus providing greater control over the timing of compound release.<sup>[53]</sup>

## 3.2 Das Antisense-Konzept

### 3.2.1 Wirkmechanismen von Antisense-Oligonukleotiden

Es gibt verschiedene Mechanismen nach denen Antisense-Oligonukleotide die Expression eines Proteins inhibieren können. In Abbildung 3-5 ist der Weg der mRNA von der Transkription bis zur Translation schematisch dargestellt und die verschiedenen Angriffspunkte ⚡ für Antisense-Oligonukleotide markiert.



**Abbildung 3-5:** Angriffspunkte von Antisense-Oligonukleotiden.

Nach der Transkription muss die prä-mRNA modifiziert werden, um zur mRNA heranzureifen. Dieser Prozess beinhaltet die Modifikation des 5'-Endes mit 7-Methylguanosin über eine Triphosphateinheit, die Verlängerung des 3'-Endes durch einen Polyadenosinrest und das Ausschneiden der Introns (Spleißen). Anschließend erfolgt die Translokation der reifen mRNA vom Zellkern in das Zytoplasma. Dort finden dann die Anlagerung der beiden Untereinheiten (60S und 40S) des Ribosoms und die Translation in das Zielprotein statt. Antisense-Oligonukleotide können an fast allen Stellen des Transkriptions-/Translationsvorgangs eingreifen. Im Zellkern können sie das 5'-Capping rückgängig machen<sup>[113]</sup> oder die 3'-Polyadenylierung verhindern (1).<sup>[114,115]</sup> Dadurch wird die prä-mRNA destabilisiert und die Translokation erschwert.<sup>[115]</sup> Auch können sie den Spleißvorgang inhibieren oder verändern (2). Dabei kommt es oft zu dem so genannten „alternativen Spleißen“, was zu einem

dysfunktionalen Protein führt.<sup>[116-118]</sup> Im Zellkern kann durch Antisense-Oligonukleotide die Translokation der mRNA in das Zytoplasma (3) oder im Zytoplasma die Anlagerung des Ribosoms bzw. dessen Fortbewegung gestört werden (4).<sup>[119]</sup> Antisense-Oligonukleotide besitzen auch einen katalytischen Wirkmechanismus, die Aktivierung der Ribonuklease H (RNase H) (5). Die Spaltung der mRNA durch die RNase H stellt aufgrund ihrer katalytischen Natur den wichtigsten und effizientesten Mechanismus von Antisense-Oligonukleotiden dar. Die RNase H ist in der Zelle für den Abbau von RNA-Primern bei der DNA-Replikation oder für das Korrigieren von fehlinsertierten RNA-Nukleotiden in die DNA verantwortlich.<sup>[120]</sup> Sie spaltet daher in einem DNA/RNA-Heteroduplex selektiv den RNA Strang. Durch den Strangbruch in der RNA ist die Bindung des Duplex stark geschwächt und es kommt zu einer Abdissoziation der DNA. Das Antisense-Oligonukleotid steht dann wieder für einen weiteren Spaltungszyklus zur Verfügung, während die ehemalige mRNA schnell durch Nukleasen abgebaut wird. Die RNase H Aktivierung kann sowohl im Zytoplasma, als auch im Zellkern stattfinden.

Untersuchungen zur Selektivität der RNase H Spaltung ergaben, dass die Breite der kleinen Furche näher an den Ausmaßen einer A-Helix, als einer B-Helix sein muss. Des Weiteren sind die Anwesenheit von  $Mg^{2+}$ -Ionen, die Flexibilität des Antisense-Oligonukleotids und die Zugänglichkeit der 2'-OH-Gruppe des RNA Strangs Voraussetzungen für eine RNase H Spaltung.<sup>[120]</sup> Modifikationen am Zucker oder dem Phosphatrückgrat, die zur Stabilisierung oder Affinitätssteigerung in die Antisense-Oligonukleotide eingebracht werden, können die RNase H Aktivität daher inhibieren.

Aufgrund der großen Fortschritte, die im Bereich der DNA-Sequenzierung gemacht wurden (siehe auch Kapitel 3.4), wird es zumindest in der theoretischen Überlegung, immer einfacher für jede beliebige Ziel-mRNA eine Antisense-Sequenz zu finden. Tatsächlich gilt es aber in der praktischen Umsetzung verschiedene Probleme zu lösen. Wie bereits für therapeutische Oligonukleotide im Allgemeinen erwähnt (siehe Kapitel 1.1) zählen dazu Instabilität gegen Nukleasen, geringe Zellaufnahme, unzureichende Selektivität bzw. Affinität und Toxizität. Bezüglich des Antisense-Konzepts kommen noch der Erhalt der RNase H Aktivierung und die Zugänglichkeit der Ziel-RNA hinzu, die durch Ausbildung von Sekundärstrukturen erschwert sein kann.

### 3.2.2 Chemische Modifikation von Antisense-Oligonukleotiden

Einige der genannten Schwierigkeiten können sehr gut durch chemische Derivatisierung der Antisense-Oligonukleotide gelöst werden. Generell können drei Typen von Modifikationen unterschieden werden: Nukleotide mit unnatürlichen Basen, modifizierten Zuckereinheiten (hauptsächlich an der 2'-Position) oder veränderten Phosphatrückgraten. Die größte Rolle spielen dabei die Zucker- und Phosphatmodifikationen,<sup>[15]</sup> weshalb sich der Rest des Kapitels darauf konzentriert. Für gewöhnlich werden sie nach der Art der Modifikation in drei Generationen eingeteilt. In Abbildung 3-6 ist ein Beispiel der chemisch modifizierten Antisense-Oligonukleotide der ersten Generation, gezeigt.

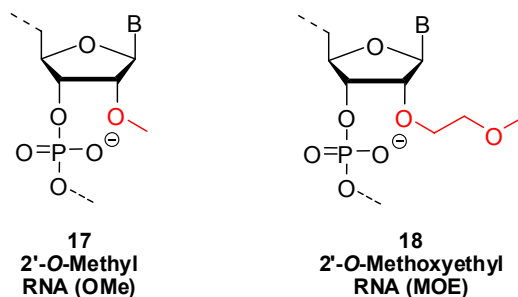


**Abbildung 3-6:** Wichtigstes Beispiel chemisch modifizierter Oligonukleotide der ersten Generation.

Die Phosphorothioate **16** sind die wichtigsten Vertreter der Antisense-Oligonukleotide der ersten Generation. Sie sind die zurzeit bekannteste und am häufigsten verwendete Modifikation.<sup>[15,121,122]</sup> In dieser Klasse von Oligonukleotiden ist ein unverbrücktes Sauerstoffatom durch ein Schwefelatom ersetzt. Sie wurden in den 1960er Jahren erstmals von *Fritz Eckstein* und Mitarbeitern synthetisiert.<sup>[123]</sup> Die Einführung der Phosphorothioate sollte in erster Linie zur Verbesserung der Nukleasebeständigkeit dienen. In der Tat weisen sie im Vergleich zu unmodifizierten Oligonukleotiden eine zehnmal höhere Halbwertszeit (9-10 Stunden) in humanem Serum auf.<sup>[124]</sup> Zusätzlich positive Eigenschaften von Phosphorothioaten sind die Ausbildung regulärer Watson-Crick Basenpaare, die Aktivierung der RNase H und ihre guten pharmakokinetischen Eigenschaften.<sup>[125]</sup> Phosphorothioate haben eine starke Affinität zu verschiedenen Serumproteinen. Das schützt sie zwar einerseits vor der Filtration aus dem Plasma und ist damit auch ein Grund für die lange Halbwertszeit, andererseits wird das aber auch für ihre Toxizität verantwortlich gemacht.<sup>[126,127]</sup> Die toxischen Nebenwirkungen treten

allerdings nur in höheren Dosen auf. Die für die Anwendung im Menschen verabreichten, niedrigeren Dosen werden generell gut vertragen. Weiterhin ist bei Phosphorthioaten zu beachten, dass durch die Substitution des Sauerstoffatoms durch ein Schwefelatom eine chirale Phosphatgruppe entsteht. Dies führt zur Bildung von  $2^n$  ( $n$  = Zahl der Phosphorthioateinheiten) Diastereomeren bei der Oligonukleotidsynthese. Die Diastereomere weisen unterschiedliche Eigenschaften bezüglich Nukleaseresistenz, Schmelzpunkte der Duplexe oder Aktivierung der RNase H auf.<sup>[128-130]</sup> Es existieren zwar Methoden zur Synthese enantiomerenreiner Phosphorthioate,<sup>[131-134]</sup> es konnte sich jedoch keine für den standardmäßigen Einsatz in der Festphasesynthese etablieren. Phosphorthioat Antisense-Oligonukleotide werden daher immer als Diastereomerengemische eingesetzt, was ihren Erfolg aber nicht geschmälert hat.

Die zweite Generation von Antisense-Oligonukleotiden zeichnet sich vornehmlich durch verschiedene Alkyl-Modifikationen an der 2'-Position der Ribose aus. In Abbildung 3-7 sind zwei Beispiele für chemisch modifizierte Antisense-Oligonukleotide der zweiten Generation gezeigt.

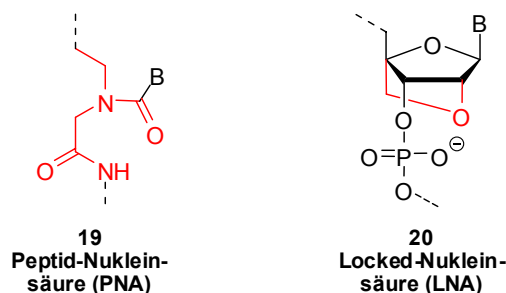


**Abbildung 3-7:** Beispiele chemisch modifizierter Antisense-Oligonukleotide der zweiten Generation.

2'-O-Methyl **17** und 2'-O-Methoxyethyl **18** sind die beiden wichtigsten Beispiele der 2'-modifizierten Oligonukleotide. Sie weisen eine höhere Affinität zu ihrer komplementären RNA als unmodifizierte Oligonukleotide oder Phosphorthioate auf. Sie sind außerdem außerordentlich stabil gegen den Abbau durch Nukleasen und haben Halbwertszeiten von bis zu 30 Tagen.<sup>[15,135]</sup> Im Gegensatz zu diesen positiven Merkmalen steht allerdings die Tatsache, dass ihre DNA/RNA-Duplexe aufgrund des sterischen Anspruchs der 2'-Modifikation in der kleinen Furche keine Substrate für die RNase H sind.<sup>[120]</sup> Sie können also als komplett derivatisierte Stränge nur dort eingesetzt werden, wo kein Abbau der mRNA notwendig oder gewollt ist. Dies ist bei allen in Kapitel 3.2.1 genannten Blockierungsmechanismen und bei der Initiierung eines

alternativen Spleißens der Fall. Da die RNase H Aktivität aber das Potential von Antisense-Ansätzen stark erhöht, werden heute meist so genannte „gapmer“ Oligonukleotide eingesetzt. Dabei flankieren die 2'-derivatisierten Nukleotide am 3'- und 5'-Ende den RNase H aktivierenden Phosphordiester- oder Phosphorthioatmittelteil. Sie vereinen somit die Stabilitätsvorteile 2'-modifizierter Nukleotideinheiten mit der Aktivierung der RNase H durch unmodifizierte oder Phosphorthioateinheiten.<sup>[15,127,135]</sup>

In der dritten Generation von Antisense-Oligonukleotiden sind eine ganze Reihe unterschiedlicher Modifikationen zu finden. Dazu gehören sowohl DNA- oder RNA-Derivate mit modifizierten Riboseeinheiten (z. B. an der 2'-Position) oder modifizierten Phosphatverbindungen, als auch Bausteine bei denen die Ribose komplett durch eine andere chemische Gruppe ersetzt ist. In Abbildung 3-8 sind zwei Beispiele chemisch modifizierter Antisense-Oligonukleotide der dritten Generation gezeigt.



**Abbildung 3-8:** Beispiele chemisch modifizierter Antisense-Oligonukleotide der dritten Generation.

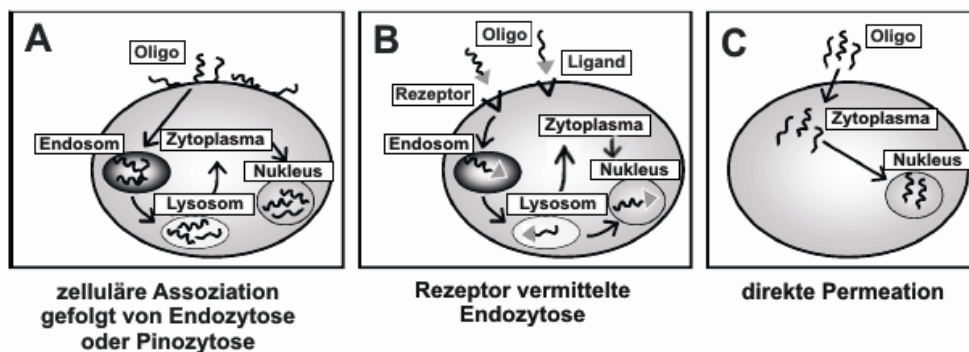
Ein Beispiel sind die Peptid-Nukleinsäuren **19** (*Peptide Nucleic Acids, PNA*), bei denen sowohl die Ribose, als auch das Phosphatrückgrat durch ein Polyamidgerüst ersetzt ist. Sie haben gute Hybridisierungs- und Nukleaseresistenzeneigenschaften und sind toxikologisch unbedenklich. Ihre schlechte Wasserlöslichkeit und Zellaufnahme sind allerdings daraus resultierende Nachteile.<sup>[15]</sup> Zu den wahrscheinlich wichtigsten Bausteinen der dritten Generation für das Design von Antisense-Oligonukleotiden haben sich die Locked-Nukleinsäuren **20** (*Locked Nucleic Acids, LNA*) entwickelt. Sie wurden 1998 erstmals in den Gruppen von Prof. Jesper Wengel und Prof. Takeshi Imanishi synthetisiert und sind durch die eingefrorene Konformation sehr nukleaseresistent.<sup>[136,137]</sup> Des Weiteren weisen sie eine außergewöhnlich hohe Affinität zu ihrer Ziel-RNA auf. Da die resultierenden Duplexe ebenfalls keine Substrate der RNase H sind werden sie vor allem in „gapmeren“ eingebaut. So konnten sehr hohe Affinitäten, gepaart mit einer effizienten RNase H Spaltung erreicht werden.<sup>[138]</sup>



Die hier vorgestellten Modifikationen sind nur eine kleine Auswahl der vielen Möglichkeiten, die zum Design der Eigenschaften von Antisense-Oligonukleotiden zur Verfügung stehen. Der Einsatz solcher chemisch modifizierter Bausteine hat maßgeblich zu den in der Einleitung bereits erwähnten therapeutischen Erfolgen von Antisense-Oligonukleotiden beigetragen.

### 3.3 Zellaufnahme von Oligonukleotiden

Aufgrund ihrer polyanionischen Natur können Oligonukleotide die Lipiddoppelschicht der Zellmembran nur mit sehr geringer Effektivität überwinden. Viele Untersuchungen zur Verbesserung der Zellaufnahme wurden und werden im Zusammenhang mit Antisense-Oligonukleotiden und siRNAs durchgeführt.<sup>[24,139-142]</sup> Die möglichen Mechanismen der Aufnahme von Oligonukleotiden sind in Abbildung 3-9 schematisch dargestellt.

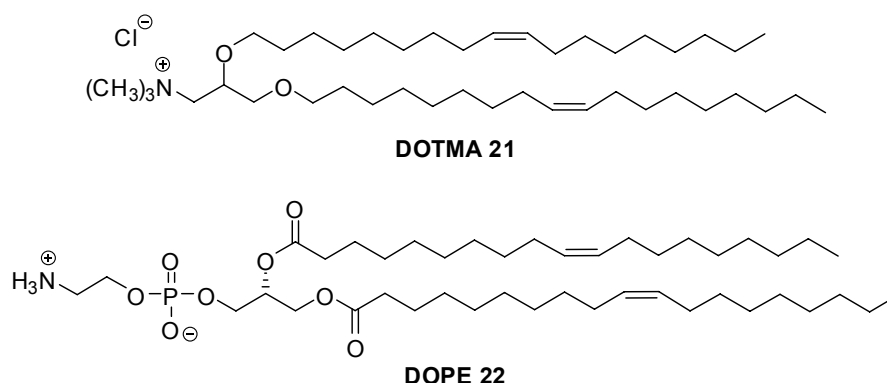


**Abbildung 3-9:** Schematische Darstellung von möglichen Zellaufnahmemechanismen von Oligonukleotiden (Quelle: *Manoharan, 2002*).<sup>[139]</sup>

Oligonukleotide können durch ungerichtete oder gezielte Assoziation an Membranrezeptoren und nachfolgende Rezeptor-vermittelte Endozytose oder durch pinozytotische Vorgänge in Zellen aufgenommen werden (A und B in Abbildung 3-9).<sup>[24]</sup> Nach der endozytotischen Aufnahme befinden sich die Oligonukleotide zunächst in den Endosomen bzw. Lysosomen. Diese enthalten neben einer ganzen Reihe von weiteren Enzymen auch Nukleasen und es ist daher notwendig stabilisierende Modifikationen, wie sie in Kapitel 3.2.2 vorgestellt wurden einzuführen. Weitere Hürden für die Entfaltung der Wirkung sind die Freisetzung aus den Lysosomen und gegebenenfalls der Eintritt in den Zellkern (siehe Kapitel 3.2.1). Die direkte Permeation eines Oligonukleotids in die Zelle (C in Abbildung 3-9) ist ein direkterer Weg zum Zielort (Zytoplasma oder Zellkern), spielt allerdings für siRNAs keine und Antisense-Oligonukleotide kaum eine Rolle.<sup>[141]</sup> Um die Verluste in Endosomen und Lysosomen kompensieren zu können ist es daher umso wichtiger, bereits bei der Aufnahme in die Zelle eine möglichst hohe Effektivität zu erreichen.

Es wurden viele verschiedene Ansätze zur Verbesserung der Zellaufnahme verfolgt. Eines der ältesten und das bis heute am häufigsten angewendete Konzept ist der Einsatz

von kationischen Lipidvektoren. Sie sind nicht kovalent gebunden sondern bilden durch elektrostatische Wechselwirkungen einen Komplex („Lipoplex“) mit den negativ geladenen Oligonukleotiden. Das erste kommerziell erhältliche, kationische Liposom *Lipofektin*<sup>®</sup> wurde 1987 von *Felgner et al.* entwickelt.<sup>[143]</sup> Es besteht aus einer 1:1-Mischung des Zytoketins *N*-[1-(2,3-Dioleoyloxy)propyl]-*N,N,N*-trimethylammoniumchlorid (DOTMA) **21** und des neutralen Lipids 1,2-Dioleoyl-*sn*-glycero-3-phosphatidylethanolmin (DOPE) **22** (Abbildung 3-10).



**Abbildung 3-10:** *Lipofektin*<sup>®</sup> (1:1-Mischung aus DOTMA **21** und DOPE **22**).

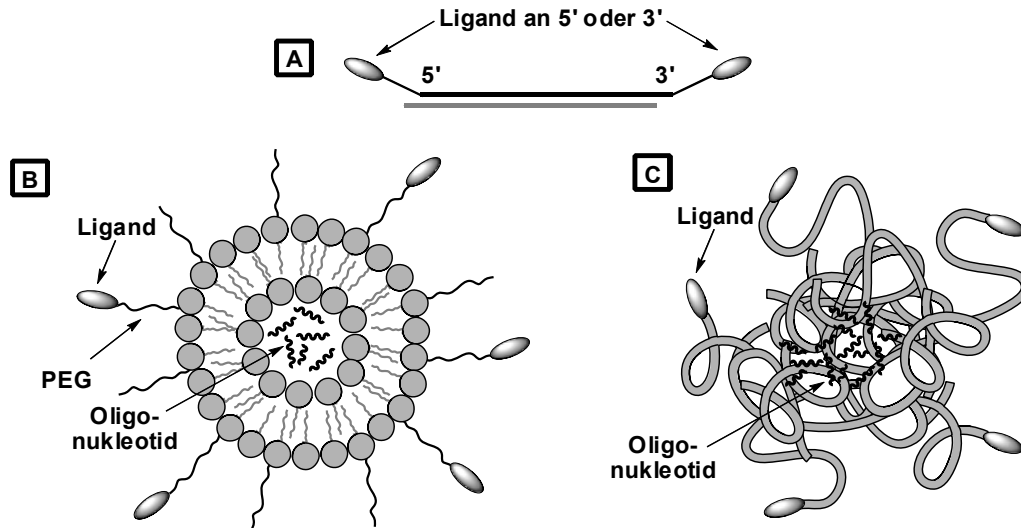
Neben den Lipiden werden auch kationische Polymere wie Poly-L-Lysin (PLL) und Polyamidoamin (PAMAM) häufig zur Komplexbildung („Polyplexe“) eingesetzt. Lipoplexe und Polyplexe adsorbieren leicht an Zellen, was zu hohen lokalen Konzentrationen an Oligonukleotiden führt und dadurch zu einer höheren Effektivität der Aufnahme.<sup>[141]</sup> Des Weiteren schützen die Lipidvesikel das Oligonukleotid nach der Aufnahme in die Zelle vor enzymatischem Abbau und verlängern so die Halbwertszeit.<sup>[142]</sup> Ein großes Problem für die *in vivo* Anwendung dieser Vektoren ist die Toxizität, vor allem der kationischen Bestandteile.

Ein weiterer Ansatzpunkt ist die Verringerung des polyanionischen Charakters durch Rückgratmodifikationen.<sup>[144-146]</sup> Darunter fallen beispielsweise Modifikationen, bei denen einer der nicht-bindenden Sauerstoffe am Phosphor gegen eine Alkyl- oder Arylgruppe ausgetauscht wurde. Beispiele hierfür sind Methyl-,<sup>[147,148]</sup> Phenyl-<sup>[148]</sup> oder Benzylphosphonate.<sup>[149,150]</sup> Letztere wurden zum ersten Mal durch *Dr. Wendelin Samstag* im Arbeitskreis von *Prof. Engels* synthetisiert.

Die zielgerichtete Aufnahme von Oligonukleotiden durch Konjugation mit Transportermolekülen und Oligonukleotid-Prodrugs sind weitere vielversprechende Ansätze, die in den folgenden Kapiteln etwas näher beleuchtet werden sollen.

### 3.3.1 Zielgerichtete Aufnahme von Oligonukleotiden

Bei der zielgerichteten Aufnahme von Oligonukleotiden an einem bestimmten Wirkort werden zwei Strategien verfolgt, die in Abbildung 3-11 schematisch dargestellt sind.<sup>[25]</sup>



**Abbildung 3-11:** Strategien zur zielgerichteten Aufnahme von Oligonukleotiden.<sup>[25]</sup>

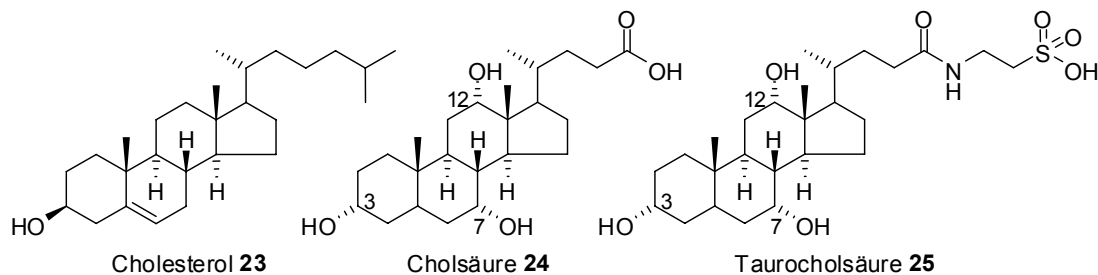
Möglichkeit **A** ist die direkte Anbindung des Liganden über einen Spacer oder Linker an das 3'- oder 5'-Ende des Oligonukleotids. Einen allgemeinen Überblick über die Vielfalt von direkten Oligonukleotid-Konjugaten und ihre Synthesemöglichkeiten geben ausführliche Übersichtsartikel von *Manoharan*,<sup>[139]</sup> *Singh et al.*<sup>[151]</sup> und *Lönnberg*.<sup>[152]</sup>

Die andere Möglichkeit ist der zielgerichtete Transport des Oligonukleotids mittels Ligand-modifizierter Nanoträger wie Lipoplexe (**B**) oder Polyplexe (**C**). Bei der Verwendung von Ligand-modifizierten Nanopartikeln als Transportmoleküle können die Liganden ebenfalls über einen Spacer (meist Polyethylenglykol, PEG), einen Linker oder direkt angebunden werden. Einen Überblick über Methoden zur chemischen Modifikation von Liposomen und Nanopartikeln, sowie über einige Aspekte der Formulierung, geben die Übersichtsartikel von *Nobs et al.*,<sup>[153]</sup> *Kichler*<sup>[154]</sup> und *Allen*.<sup>[155]</sup>

Zielgerichtete Liganden, die in diesem Zusammenhang untersucht wurden sind beispielsweise Steroide wie Cholesterol und Gallensäuren, Lipide, Folsäure, Transferrin, Antikörper, Aptamere, (Oligo)Saccharide und vor allem Peptide.<sup>[25]</sup> Im folgenden Abschnitt wird auf die Verwendung von Gallensäuren als Transportermoleküle näher eingegangen.

### Gallensäuren als Transportmoleküle

Gallensäuren wie Cholsäure **24** und Taurocholsäure **25** sind Abbauprodukte des Cholesterols **23** (Abbildung 3-12).



**Abbildung 3-12:** Struktur von Cholesterol **23**, Cholsäure **24** und Taurocholsäure **25** mit Nummerierung der hydroxylierten Positionen.

Der Abbau des Cholesterols **23** bzw. die Synthese der Gallensäuren findet in den Hepatozyten statt. Die charakteristische Säurefunktion entsteht durch enzymatische Verkürzung der Alkylseitenkette des Cholesterols **23**. Eine ganze Reihe verschiedener Gallensäuren entsteht dann durch unterschiedliche Hydroxylierungsgrade der Positionen 3, 6, 7 und 12. Außerdem werden durch Amidierung der freien Carbonsäure Glycin- oder Taurinderivate hergestellt. Gallensäuren zeichnen sich durch ihren sehr ausgeprägten amphiphilen Charakter aus. Durch die *cis*-verknüpften Ringe A und B besitzen sie eine konvexe, hydrophobe  $\beta$ -Seite, eine konkave, hydrophile Unterseite sowie die negativ geladene Carbonsäure in der Seitenkette. Neben den dadurch bedingten grenzflächenaktiven Eigenschaften bilden sie bereitwillig Mizellen aus, was für ihre physiologische Funktion von zentraler Bedeutung ist.<sup>[156]</sup>

Der Grund für das große Angebot aktiver Gallensäuren-Transporter ist ihre biologische Funktion im enterohepatischen Kreislauf. Während dieses Kreislaufs werden die Gallensäuren im Dünndarm, in den Enterozyten in der Leber und in der Galle durch mehrere spezifische Systeme transportiert. Der enterohepatische Kreislauf wird täglich bis zu 10 Mal durchlaufen. Bei einem Vorrat an Gallensäuren im Menschen von etwa 3 g wird somit eine durchschnittliche Menge von 30 g pro Tag transportiert.<sup>[157]</sup> Diese hohe Kapazität der aktiven Transportsysteme macht sie für den Transport pharmakologischer Wirkstoffe in diesem Bereich äußerst interessant.

Im Rahmen einer umfangreichen Studie aus dem Jahr 1999 zur Substratspezifität des ilealen und des hepatischen  $\text{Na}^+$ /Gallensäure-Cotransporters zeigte sich, dass die  $3\alpha$ -OH-Gruppe nicht essentiell für eine hohe Affinität zu den beiden Transportern ist.

Daraus lässt sich ableiten, dass die 3-Position von Gallensäuren die ideale Position zur Anbindung von Wirkstoffen ist.<sup>[158]</sup> Im Gegensatz dazu stellte sich die Anbindung an die freie Carboxylgruppe in der Seitenkette als nachteilig für beide Transporter heraus. Die ersten Konjugate von Oligonukleotiden mit Cholsäure **24** wurden 1994 von *Manoharan et al.*<sup>[159]</sup> und fast zeitgleich von *Chow et al.*<sup>[160]</sup> hergestellt. Diese Konjugate wurden über die Säurefunktion verbunden, da sie die synthetisch einfacher zugängliche Position darstellt. Die Ergebnisse dieser beiden Studien waren sehr unterschiedlich. *Manoharan et al.* beobachteten einen starken Anstieg der Halbwertszeit des untersuchten, 3'-modifizierten Antisense-Oligonukleotids von 0.5 Stunden auf > 24 Stunden aber keine verbesserte Zellaufnahme.<sup>[159]</sup> *Chow et al.* hingegen beobachteten eine verbesserte Zellaufnahme von Cholesterol beziehungsweise Cholsäure modifizierten Antisense-Oligonukleotide in Neutrophilen, führten diese aber auf die Erhöhung der Lipophilie zurück.<sup>[160]</sup>

Sehr aufschlussreiche *in vivo* Untersuchungen zur Aufnahme und Verteilung von Cholsäure modifizierten (Antisense-)Oligonukleotiden wurden von *Prof. Ernst Petzinger, Prof. Werner Kramer* und deren Mitarbeiter durchgeführt.<sup>[26-28]</sup> Es wurden <sup>35</sup>S-radioaktiv markierte, gemischt Rückgrat-modifizierte (Phosphorthioat/Phosphordiester) 15mer Oligonukleotide synthetisiert und an Cholsäure **24** über deren 3 $\alpha$ -Hydroxygruppe gekuppelt. Dabei wurden ein 3'-Cholsäure modifiziertes und ein 5', 3'-bis-Cholsäure modifiziertes Oligonukleotid mit dem unmodifizierten Strang verglichen. *In vivo* wurden die drei Oligonukleotide an Ratten bezüglich ihrer Exkretion in die Galle und ihrem zurückbleibenden Gehalt im Lebergewebe untersucht.<sup>[27,28]</sup> Tatsächlich wurde, bezogen auf das unmodifizierte Oligonukleotid, eine 1.7mal höhere Gesamtmenge des mono-modifizierten und sogar eine 5mal höhere Menge des bis-modifizierten Oligonukleotids in der Galle gefunden. Daraus kann bereits auf eine vorausgegangene erhöhte Konzentration in der Leber geschlossen werden. Allerdings erfolgte die Exkretion der modifizierten Oligonukleotide schneller als die des unmodifizierten Strangs. Dadurch wird die Verweilzeit in der Leber verringert. Es wurde aber nach Beendigung der Exkretionsuntersuchung (nach 2 Stunden) auch das Lebergewebe auf den zurückgebliebenen Gehalt an Oligonukleotid untersucht. Dort wurde die doppelte Konzentration an bis-modifiziertem Oligonukleotid im Vergleich zum Unmodifizierten gefunden. Der aktive Transport in die Leber konnte durch

Experimente an TR(-) Ratten, denen der notwendige Transporter fehlt, nachgewiesen werden.<sup>[28]</sup> Verglichen mit den jeweiligen Ergebnissen in den normalen Ratten, verringerte sich die Gesamtmenge in beiden Fällen (unmodifiziert und bis-modifiziert) um etwa die Hälfte bis zu einem Drittel. Die aufgenommene und eliminierte Menge an doppelt Cholsäure-gekuppeltem Oligonukleotid war aber immer noch signifikant höher als die des freien Oligonukleotids. In allen durchgeführten Studien wurde keine negative Beeinflussung der Aktivität des Antisense-Oligonukleotids durch die Konjugation mit den Cholsäuremolekülen an der 3'- und/oder 5'-Position gefunden. Zusammenfassend zeigen diese Ergebnisse:

- 1) dass die Oligonukleotid-Cholsäure Konjugaten von aktiven Transportern akzeptiert werden.
- 2) dass mit Oligonukleotid-Cholsäure Konjugaten höhere Konzentrationen in der Leber erreicht werden können als mit unmodifizierten Oligonukleotiden, was sie zu einem interessanten Werkzeug für die zielgerichtete Aufnahme von Oligonukleotiden in die Leber macht.
- 3) dass ein Problem dieses Ansatzes die sehr schnelle Exkretion der Konjugate in die Galle ist, da dadurch die Verweildauer in der Leber stark reduziert wird.

Neben der Cholsäure **24** selbst ist die Taurocholsäure **25** als Konjugat zur zielgerichteten Zellaufnahme von Oligonukleotiden besonders interessant. Für Taurocholsäure **25** sind sehr spezifische Transportsysteme in der Zellmembran von Hepatozyten, wie beispielsweise der NTCP Transporter (Na<sup>+</sup>/taurocholate cotransporting polypeptide) bekannt. Die ersten 5'-Taurocholsäure modifizierten Antisense-Oligonukleotide wurden im Arbeitskreis von *Prof. Engels* durch *Dr. Thomas Lehmann* im Rahmen seiner Dissertation synthetisiert.<sup>[161-163]</sup> Dabei war das Ziel geeignete Kandidaten für den potentiellen Einsatz zur Behandlung von Hepatitis C (HCV) Viruserkrankungen zu evaluieren. Dazu wurden Cholesterol **23**, Cholsäure **24** und Taurocholsäure **25** derivatisierte Antisense-Oligonukleotide synthetisiert und ihre Eigenschaften untersucht. In Zusammenarbeit mit der Arbeitsgruppe von *Prof. Wolfgang Caselmann* aus Bonn wurden die synthetisierten Oligonukleotide *in vitro* auf ihr Inhibitionspotential gegen eine ausgewählte HCV-Sequenz getestet. Alle Konjugate zeigten eine spezifische, dosisabhängige Inhibierung der HCV-Genexpression, wobei das Taurocholsäurederivat die besten Ergebnisse erzielte. Auch erste Zellaufnahmetests

zeigten positive Ergebnisse für das Taurocholsäurekonjugat. Aufgrund dieser Resultate von *Dr. Thomas Lehmann* und auch anderer Erfolge von Wirkstoff-Taurocholsäure Konjugaten<sup>[164-168]</sup> scheint Taurocholsäure **25** ein hohes Potential als Ligand für die zielgerichtete Aufnahme von Oligonukleotiden in die Leber zu besitzen.

Das Problem der schnellen Eliminierung in die Galle durch die Konjugation mit Cholsäure **24** zeigt, dass zielgerichtete Konjugate auch Nachteile aufweisen können. Ein Lösungsansatz ist hier die Verknüpfung des Oligonukleotids mit dem Liganden über einen spaltbaren Linker. Solch ein reversibel modifiziertes Oligonukleotid kann als Prodrug aufgefasst werden. Im folgenden Kapitel soll daher näher auf Prodrugansätze mit Oligonukleotiden eingegangen werden.

### 3.3.2 Oligonukleotid-Prodrugs

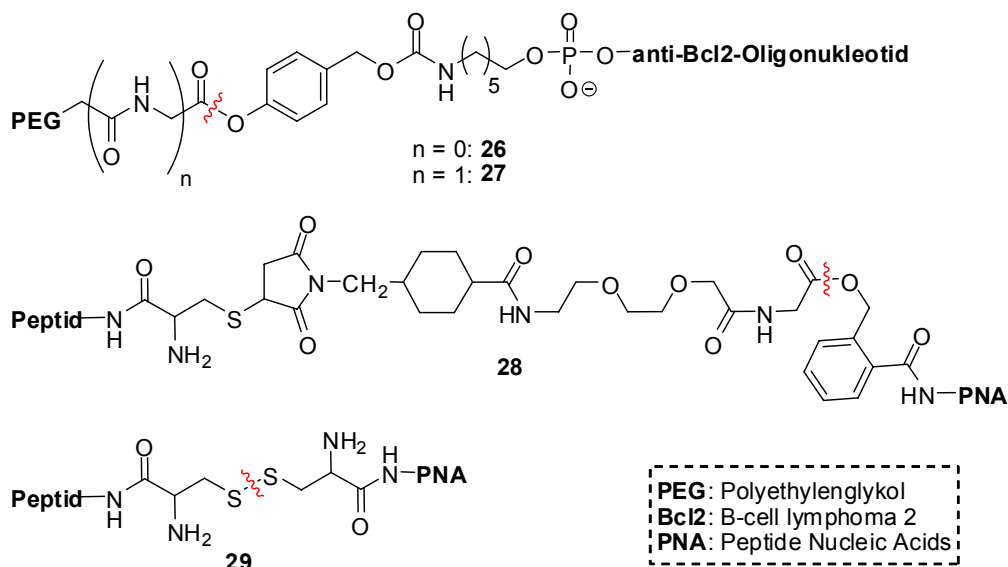
Eine der Prodrugstrategien für Oligonukleotide ist die temporäre Neutralisierung der negativen Ladung durch Verwendung einer bioreversiblen Schutzgruppe. Die bekanntesten sind hierbei die *S*-Acyl-2-thioethyl(SATE)-Prooligonukleotide, die von *Imbach et al.* entwickelt wurden.<sup>[169-171]</sup> Die so modifizierten Oligonukleotide werden durch Carboxyesterasen, deren Vorkommen typisch für das intrazelluläre Medium ist, in die ungeschützte Form überführt. Einige weitere Beispiele für Oligonukleotid-Prodrugs, die auf diesem Ansatz basieren sind in dem Übersichtsartikel von *Poijärvi-Virta und Lönnberg*<sup>[84]</sup> zu finden.

Ein anderer Ansatz ist wie zuvor bereits erwähnt der Einsatz spaltbarer Linker in Kombination mit Liganden für eine zielgerichtete Aufnahme von Oligonukleotiden. Es gibt bisher noch nicht viele Beispiele für die Verwendung von Oligonukleotidkonjugaten mit spaltbaren Linkern. Die am häufigsten untersuchte, spaltbare Einheit im Zusammenhang mit der Aufnahme von Oligonukleotiden oder auch Plasmid-DNA ist die Disulfidgruppe. Dies ist sicherlich zum einen in ihrer einfachen Einführbarkeit begründet. Außerdem sind durch die Untersuchung der Proteinfaltung sowie durch andere Prodruganwendungen, beispielsweise im Bereich der Onkologie,<sup>[71]</sup> umfangreiche Erfahrungen mit dieser funktionellen Gruppe vorhanden. Zwei aktuelle Übersichtsartikel von *Ouyang et al.*<sup>[172]</sup> und *Bauhuber et al.*<sup>[173]</sup> beschäftigen sich mit Disulfid basierten Transportsystemen für Gene und



Oligonukleotide. Allerdings liegt hier das Hauptaugenmerk auf der Verwendung der spaltbaren Gruppen in den liposomalen oder polymeren Transportvektoren, um die Freisetzung der eingeschlossenen Nukleinsäuren in der Zelle durch Abbau der Vektoren zu erleichtern. In dem Artikel von *Bauhuber et al.* werden auch einige Arbeiten erwähnt, in denen Disulfidlinker zur Anbindung von zielgerichteten Liganden wie CPPs (cell penetrating peptides),<sup>[174,175]</sup> Asialoglykoprotein<sup>[176]</sup> oder Mannose-6-Phosphat<sup>[177]</sup> eingesetzt wurden. Allerdings wurden die Ergebnisse nur mit den unkonjugierten Oligonukleotiden verglichen und kein Schwerpunkt auf die Untersuchung des Einflusses des spaltbaren Linkers gelegt.

Es gibt aber dennoch einige Beispiele, bei denen gezielt der Einfluss des Linkers untersucht wurde und der Einsatz eines spaltbaren Linkers positive Ergebnisse zeigte.<sup>[31,178-181]</sup> In Abbildung 3-13 sind drei Beispiele gezeigt.<sup>[178,180,181]</sup>



**Abbildung 3-13:** Beispiele spaltbarer Linker für den Einsatz zur zielgerichteten Zellaufnahme von Oligonukleotiden.

Die ersten beiden Strukturen **26** und **27** zeigen enzymatisch spaltbare Linker, die zur Abspaltung eines PEG-Transporters eingesetzt wurden. Die Spaltung erfolgt durch enzymatische Hydrolyse des Phenylesters im Zytoplasma und anschließendem, spontanem Zerfall des Linkers.<sup>[178,181]</sup> Der PEG-Transporters hatte die Aufgabe, die pharmakokinetischen Eigenschaften eines anti-Bcl2 (anti-B-cell lymphoma 2) Antisense-Oligonukleotids positiv zu beeinflussen. Außerdem sollte dadurch die Immunstimulation durch CpG-Motive im Oligonukleotid unterdrückt werden. In der Studie wurden die spaltbaren Linker **26** und **27** sowie nichtspaltbare Linker an die

5'- oder 3'-Position des Oligonukleotids angebunden und *in vitro* bzw. *in vivo* untersucht. Die besten Ergebnisse wurden mit den an der 5'-Position angebundenen, spaltbaren Linkern **26** und **27** erzielt. Überraschenderweise waren die Ergebnisse der *in vitro* Zellaufnahme der Konjugate schlechter, als die des unmodifizierten Oligonukleotids. *In vivo* zeigten alle PEG-gebundenen Oligonukleotide allerdings verbesserte pharmakokinetische Eigenschaften, vor allem eine wesentlich erhöhte Halbwertszeit. Doch nur die Oligonukleotide, die durch einen spaltbaren Linker an das PEG gebunden wurden zeigten außerdem eine vollständige Unterdrückung der Immunstimulation. Das trotz der schlechteren *in vitro* Zellaufnahme so gute antitumorale *in vivo* Ergebnisse in Mäusen durch Verbindung **26** erzielt wurden war überraschend. Als Grund hierfür wird die langsame aber kontinuierliche Abgabe des Oligonukleotids aus den spaltbaren PEG-Konjugaten **26** und **27** vermutet.<sup>[181]</sup>

Die beiden Linker **28** und **29** wurden in einer gemeinsamen Studie untersucht. Die Spaltung des Linkers **28** erfolgt über eine hydrolytische Esterspaltung, die des Linkers **29** über eine reduktive Spaltung, beispielsweise durch Glutathion.<sup>[180]</sup> Im Rahmen dieser Studie wurden sieben PNA-CPP Konjugate mit vier unterschiedlichen Anbindungsmethoden untersucht. Die Kupplung erfolgte über die beiden spaltbaren Linker **28** und **29**, einen nichtspaltbaren Linker ähnlich der Verbindung **28** und als Vergleich über direkte Verknüpfung.<sup>[180]</sup> Als *in vitro* Testsystem wurde eine HeLa-Zelllinie verwendet, in der die eingesetzte PNA ein inkorrektes Spleißen in der Luciferase mRNA korrigieren sollte. Es zeigte sich folgende Reihenfolge in der Effektivität beim Vergleich der verschiedenen Linkertypen mit Transportan als CPP: permanente Linker < Ester Linker **28** ≤ Disulfid Linker **29**. Nicht alle eingesetzten CPPs zeigten eine effektive Zellaufnahme und damit eine gute Aktivität. Des Weiteren war die Aktivität der Konjugate auch vom Ort der Anbindung an das Peptid abhängig. Es stellte sich heraus, dass eine Verknüpfung über den N-Terminus vorteilhafter gegenüber dem C-Terminus ist. Insgesamt brachte hier die Verwendung von spaltbaren Linkern die potenteren Konjugate hervor. Die Länge des Linkers spielte dabei in dieser Untersuchung keine große Rolle.

Aus diesen doch zum Teil sehr unterschiedlichen Ergebnissen lassen sich trotzdem einige Erkenntnisse ableiten. Im Allgemeinen zeigen Konjugate mit spaltbaren Linkern meist bessere Eigenschaften als die permanent verbunden. Der Zusammenhang

zwischen Struktur und Wirkung scheint aber sehr komplex und von Testsystem zu Testsystem, sowie von *in vitro* zu *in vivo* Anwendung sehr verschieden zu sein. Die vorgestellten Beispiele zeigen, dass der Einsatz spaltbarer Linker für Prodruganwendungen von Oligonukleotiden ein sehr interessantes Forschungsgebiet ist, auf dem es noch sehr viele Fragen zu klären und Zusammenhänge zu verstehen gilt.

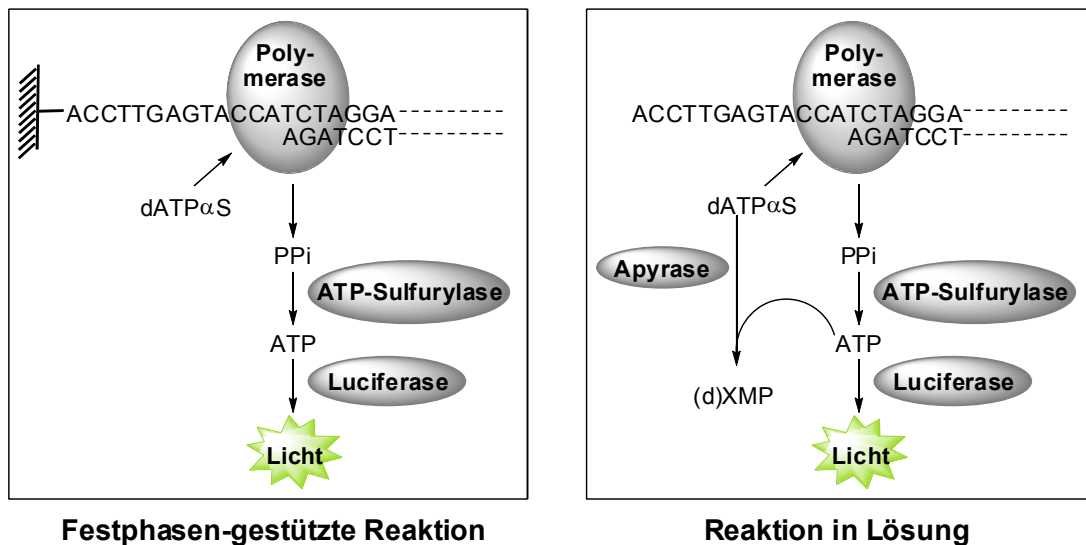
## 3.4 Neue Generation der DNA-Sequenzierung

In Kapitel 1.2 wurden bereits die neuen Anwendungsziele der DNA-Sequenzierung, wie „personalisierte Medizin“, in der so genannten „post-genomischen Ära“ vorgestellt. Zu ihrer Realisierung sind neue Methoden zur Hochdurchsatzsequenzierung notwendig. Das hat die DNA-Sequenzierung zu einem der sich am schnellsten entwickelnden Forschungsgebiete im „Life Science“-Bereich gemacht.

Ein umfassender Überblick über die neuen Ansätze zu DNA-Sequenzierung, die sich zum großen Teil noch in der Entwicklung befinden, würde den Rahmen dieser Arbeit übersteigen. Daher wird auf eine Reihe exzellenter Review Artikel und Buchkapitel verwiesen.<sup>[182-189]</sup> Einige der wichtigsten Technologien, die auf der Idee des *Sequenzierens durch Synthese* (*Sequencing-by-Synthesis*) basieren werden in den folgenden Kapiteln vorgestellt.

### 3.4.1 Pyrosequenzierung

Pyrosequenzierung wurde als neue Methode zur DNA-Sequenzierung bereits 1988 durch *Edward Hyman* publiziert.<sup>[190]</sup> Der Ansatz basiert, wie die Sanger Sequenzierungsmethode, auf der Polymerasekettenreaktion. Die Detektion des Einbaus erfolgt dabei in Echtzeit mittels einer durch Pyrophosphat ausgelösten, enzymatischen Reaktionskaskade.<sup>[191]</sup> Die Pyrosequenzierung kann sowohl Festphasen-gestützt,<sup>[192-194]</sup> als auch in Lösung<sup>[194,195]</sup> durchgeführt werden. In Abbildung 3-14 sind die Reaktionsschemata der Festphasen-gestützten Reaktion und der Reaktion in Lösung gezeigt.



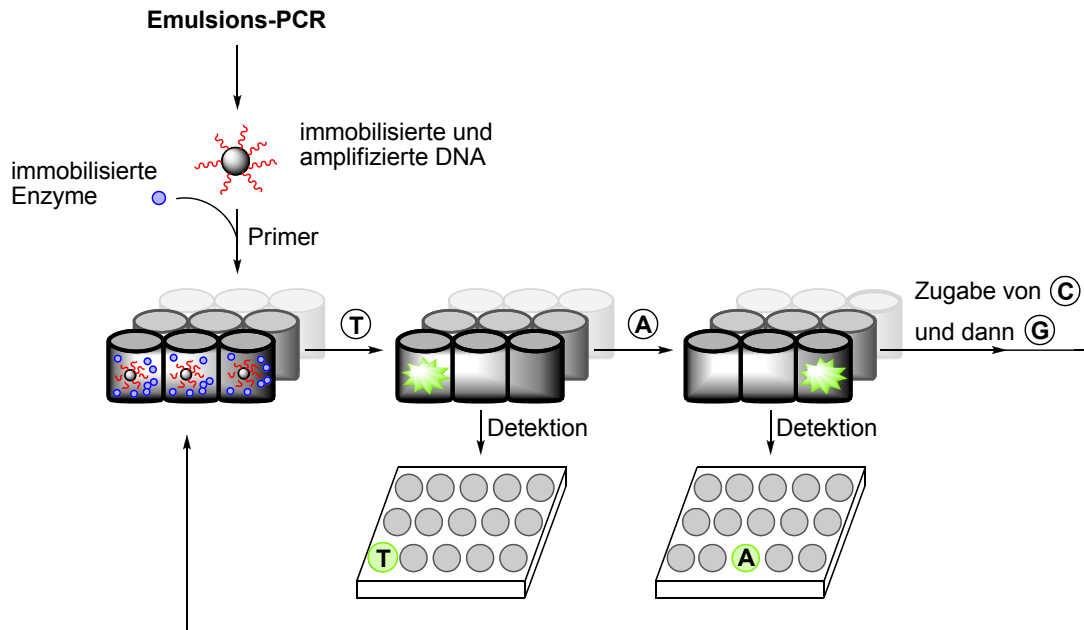
**Abbildung 3-14:** Reaktionsschemata der Festphasen-gestützten Pyrosequenzierungsreaktion und der Reaktion in Lösung.

Vor der Durchführung der Sequenzierungsreaktion ist eine Amplifikation der Template mittels PCR notwendig. Im Fall der Festphasen-gestützten Reaktion wird die Amplifizierung mit Biotin markierten Primern durchgeführt. Als feste Phase dienen Streptavidin-funktionalisierte, magnetische Kugeln. Dadurch können die PCR Produkte direkt aus der Reaktionslösung heraus an die feste Phase gebunden und so gleichzeitig aufgereinigt werden.

Die Idee der Pyrosequenzierung basiert auf der Freisetzung von Pyrophosphat beim Einbau eines Nukleotids durch die DNA-Polymerase (z.B. exo-Klenow Fragment aus *E. coli*). Das Pyrophosphat wird dann durch die ATP-Sulfurylase (z. B. aus *S. cerevisiae*) zur Synthese von Adenosin-5'-triphosphat (ATP) verwendet. ATP ist wiederum ein Substrat für die Luciferase aus dem amerikanischen Leuchtkäfer *P. pyralis*, die es zusammen mit Sauerstoff zur Oxidation von Luciferin zu Oxyluciferin verwendet. Bei dieser Reaktion entsteht sichtbares Licht (560 nm), das durch eine CCD(charge-coupled device)-Kamera oder eine Photodiode detektiert wird. Da eine Unterscheidung der vier Nukleotide nicht möglich ist, kann pro Verlängerungsschritt nur eines der vier 2'-Desoxynukleotid-5'-triphosphate zugesetzt werden. Die Entfernung der überschüssigen Reagenzien erfolgt bei der Reaktion an der festen Phase (links in Abbildung 3-15) durch Waschschrte. Bei der Reaktion in Lösung hingegen sind Waschschrte nicht möglich. Daher wird hier anstatt des Drei-Enzym-Systems ein Vier-Enzym-System verwendet, bei dem zusätzlich das Enzym Apyrase zugesetzt wird. Apyrase baut

die Triphosphateinheit zu einer Monophosphateinheit ab und deaktiviert so die überschüssigen Nukleotide für einen weiteren Einbau durch die DNA-Polymerase. In beiden Methoden wird anstatt des natürlichen 2'-Desoxyadenosin-5'-triphosphats das 5'- $\alpha$ -Monothiotriphosphat verwendet. 2'-Desoxyadenosin-5'-triphosphat ist neben ATP auch ein Substrat für die Luciferase und führte daher zu einem hohen Hintergrundsignal. 2'-Desoxyadenosin-5'- $\alpha$ -monothiotriphosphat ist im Gegensatz dazu kein Substrat für die Luciferase, wodurch die Hintergrundsignale deutlich verringert werden konnten.

Die Pyrosequenzierung wurde zunächst hauptsächlich zur Detektion von *single nucleotide polymorphisms* (SNPs), zum Resequenzieren oder zur Analyse von Sequenzen mit komplexen Sekundärstrukturen wie Hairpins angewendet.<sup>[194]</sup> Die Methode war hauptsächlich durch die Leselänge (max. 200 Nukleotide) und die Probleme bei der Detektion von homopolymeren Regionen sowie polymorphen Regionen in heterozygotem DNA-Material limitiert. Durch weitere Entwicklungen wie die Zugabe des ssDNA-Bindungsproteins zur Verbesserung der Leselänge<sup>[196]</sup> und die Automatisierung in Pikoliter Reaktoren war die Pyrosequenzierungsmethode trotzdem die erste, die in einem kommerziellen Hochdurchsatzsequenzierer der zweiten Generation (*Genome Sequencer 20*) von *454 Life Science* 2005 verwirklicht werden konnte.<sup>[197]</sup> In diesem Zusammenhang konnte auch die Eignung für *de novo* Sequenzierungen am Beispiel von zwei bakteriellen Genomen erstmals gezeigt werden. Nach der Übernahme von *454 Life Science* durch *Roche Applied Science* 2007 wurde eine zweite Generation des *Genome Sequencers 20*, der *Genome Sequencer FLX* auf den Markt gebracht. Mittlerweile sind mit diesem Gerät Leselängen von 400 Basenpaaren möglich und es können in einem Durchlauf bis zu 500 Millionen Basenpaare sequenziert werden. In Abbildung 3-15 ist die Funktionsweise des Sequenziergeräts schematisch dargestellt.



**Abbildung 3-15:** Schematische Darstellung der Funktionsweise des 454/Roche *Genome Sequencer FLX*.<sup>[198]</sup>

Der *Genome Sequencer FLX* basiert auf der Festphasen-gestützten Methode des Pyrosequenzierens. Wichtige Verbesserungen wurden hier im Rahmen der Amplifikation durch den Einsatz der Emulsions-PCR erreicht.<sup>[199]</sup> Jede Kugel trägt anschließend nur eine amplifizierte Templatsequenz und die Oligonukleotide sind über einen Adapterprimer angebunden. Die Reaktion findet in faseroptischen Pikotiter-Platten mit einer Größe von ca. 29 µm statt. In jede Kavität passt somit genau eine der Kugeln. Um den Verbrauch der Enzyme ATP-Sulfonylase und Luciferase zu reduzieren sind auch diese immobilisiert. Sie werden zusammen mit der DNA-Polymerase in die Vertiefungen der Platte gegeben. Die Pikotiter-Platte wird in dem Sequenzierungsgerät platziert, das die Funktion einer Flusszelle zum Zugeben und Abführen von Reagenzien hat (dATPαS, dTTP, dCTP, dGTP und Luciferin). Die Unterseite der Platte steht direkt im Kontakt mit einer CCD-Kamera, durch die nach jedem Einbau die Detektion erfolgt. Die Zugabe der vier Nukleotide erfolgt nacheinander mit zwischengelagerten Waschschritten, bei denen zusätzlich Apyrase zugesetzt wird. Die Lichtemission erfolgt nur dort, wo ein zum Templatstrang komplementäres Nukleotid eingebaut wurde. Die Schwierigkeiten bei der Detektion homopolymerer Bereiche soll dabei durch einen Metallüberzug der Pikotiter-Platte verbessert werden.

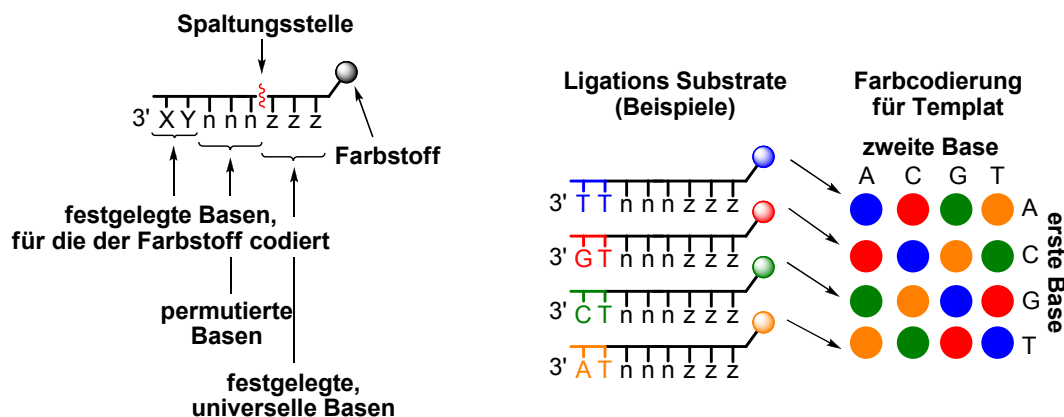
Trotz der Schwächen in der Genauigkeit hat sich die Pyrosequenzierung als „second generation“ Sequenzierungsmethode etabliert und wurde in vielen Bereichen wie der

Sequenzierung von Bakteriengenomen,<sup>[197,200,201]</sup> der Analyse von SNPs<sup>[202-204]</sup> oder der Sequenzierung sehr alter DNA wie beispielsweise des Neandertalers<sup>[205]</sup> oder des Mammuts<sup>[206]</sup> erfolgreich eingesetzt.

### 3.4.2 Sequenzierung durch Ligation

Die erste Methode zur automatisierten Sequenzierung von DNA unter Verwendung einer Ligase anstatt einer Polymerase wurde 2005 durch *Shendure et al.* veröffentlicht. Zum Nachweis der Machbarkeit wurde mit der entwickelten Methode das *E. coli* Genom resequenziert.<sup>[207]</sup>

Durch *Applied Biosystems* wurde dieses Ansatzes weiterentwickelt und 2007 der *SOLiD<sup>TM</sup>* Sequenzierer (*Supported Oligonucleotide Ligation and Detection*) auf den Markt gebracht. Die Sequenzanalyse beruht auf Ligationsreaktionen mit den in Abbildung 3-16 gezeigten Substraten.

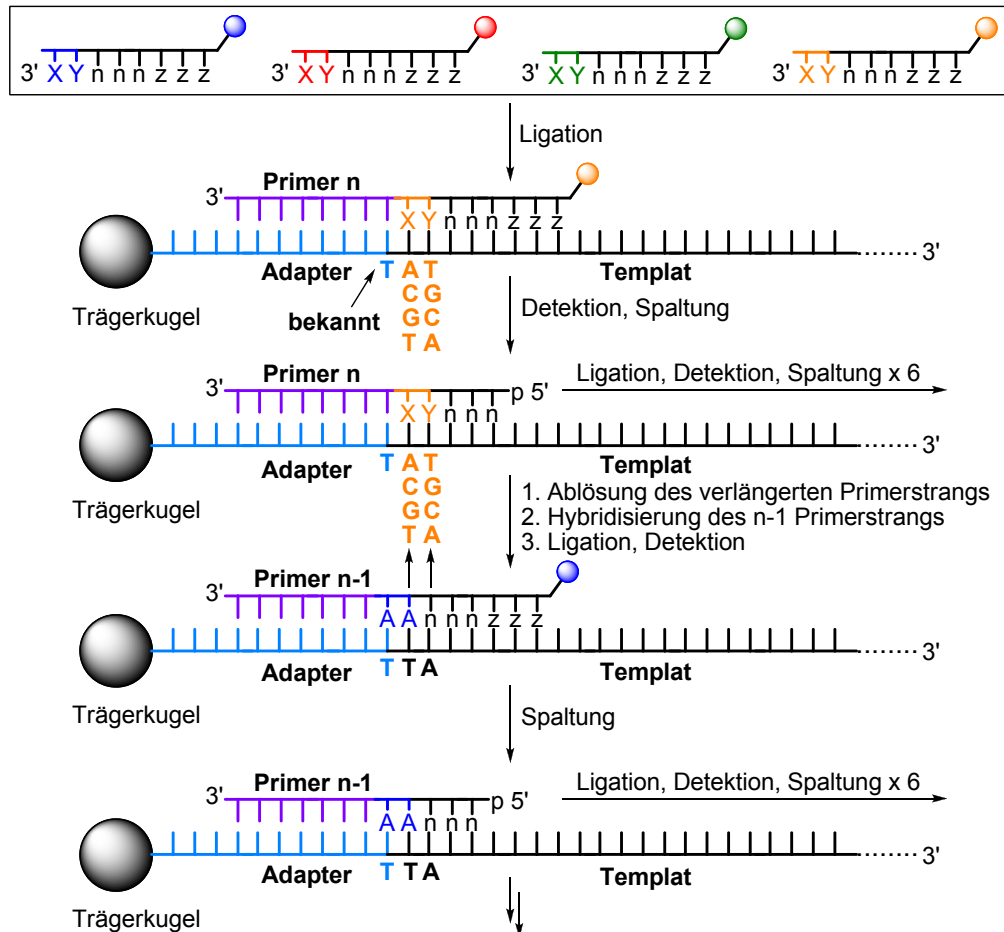


**Abbildung 3-16:** Veränderte Substrate und Farbcodierung für das *SOLiD<sup>TM</sup>* System von *Applied Biosystems*.<sup>[188]</sup>

Bei den Substraten für die Ligrationsreaktion handelt es sich um Oktamere, bei denen die beiden ersten Basen am 3'-Ende festgelegt sind. Diesen folgen drei variable Basen (n), und drei universelle Basen (z). Die drei universellen Basen (z) bleiben konstant, die drei variablen Basen (n) werden permutiert. Das bedeutet, es gibt 256 Oktamere mit dem gleichen, festgelegten Dimer (XY) und allen möglichen Variationen der drei Basen n. Insgesamt werden pro Sequenzierungsschritt 1024 Oligonukleotide benötigt. Davon tragen 256 den gleichen Fluoreszenzfarbstoff und codieren für vier unterschiedliche Dinukleotide (XY). Sobald eines der beiden festgelegten Nukleotide bekannt ist, ist das andere ebenfalls eindeutig identifiziert (siehe Farbcodierung in Abbildung 3-16). Der Farbstoff ist am 5'-Ende angebunden und wird nach erfolgreichem Einbau durch die T4



DNA-Ligase und Detektion zusammen mit den drei universellen Basen chemisch abgespalten. Dadurch sind mehrfache Ligationsschritte an einem Templat möglich. Das Prinzip des *SOLiD*<sup>TM</sup> Systems ist in Abbildung 3-17 dargestellt.



**Abbildung 3-17:** Prinzip des *SOLiD*<sup>TM</sup> Systems von Applied Biosystems.<sup>[188]</sup>

Nur mit dem Oligonukleotid der richtigen Sequenz findet die erste Verlängerung statt. Da aber vier unterschiedliche Dinukleotide den gleichen Farbstoff tragen (siehe Farbcodierung in Abbildung 3-16), kann man nach der Detektion nur eine Einschränkung auf eben diese vier möglichen Varianten (TA, GC, CG und AT, in orange gezeigt) vornehmen. Nach Abspaltung des Farbstoffs und der drei universellen Basen werden sechs weitere solcher Zyklen aus Ligation, Detektion und Spaltung durchgeführt und somit sechs weitere Kombinationen aus vier möglichen Dinukleotiden ermittelt. Nach der ersten beendeten Runde wird der verlängerte Primer abgelöst und der Primer für die nächste Sequenzierungsrunde an das Templat hybridisiert. Dieser ist um ein Nukleotid kürzer als der vorhergehende. Die erste, bekannte Base am 3'-Ende des Adapters (hellblaues T) wird nun im ersten Verlängerungsschritt mitsequenziert. Da

die Sequenz des Adapters bekannt ist, ist durch die Detektion der blauen Farbe klar, dass es sich bei dem eingebauten Oligonukleotid um das Dinukleotid AA handeln muss und daraus folgend bei der ersten Base am 5'-Ende des Templates um T. Da nun die erste Base aus dem ersten Sequenzierungsschritt bekannt ist kann außerdem auf die zweite Base im ersten Dinukleotid geschlossen werden. Es muss sich dabei um ein A im Templatestrang handeln.

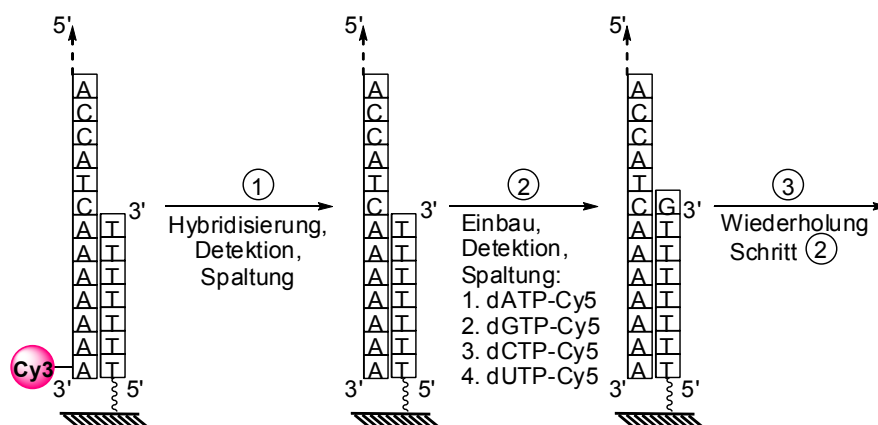
Mit dem *SOLiD*<sup>TM</sup> Gerät können in einem kompletten Sequenzierungsdurchgang bis zu vier Milliarden Basen sequenziert werden. Allerdings dauert das sechs Tage, da die maximale Leselänge lediglich 35 Basen beträgt.<sup>[188]</sup> Trotzdem wurde es in vielen Anwendungen wie der Sequenzierung einer großen Anzahl humaner Exons<sup>[208]</sup> oder der Detektion seltener Mutationen im Zusammenhang mit Resistenzen gegen Kinaseinhibitoren bei Patienten mit chronischer myeloider Leukämie<sup>[209]</sup> erfolgreich eingesetzt.

### **3.4.3 Träger-gestützte Einzelmolekülsequenzierung durch Synthese**

Die bisher beschriebenen Methoden (*Pyrosequenzierung* (Kapitel 3.4.1) und *Sequenzierung durch Ligation* (Kapitel 3.4.2)) benötigen einen Amplifizierungsschritt der DNA. Das ist aufwändig und zeitintensiv und es ist daher wünschenswert die Sequenzanalyse an einzelnen DNA-Molekülen durchzuführen. Neben der Einsparung der Amplifikation hat die Sequenzierung an einzelnen DNA-Molekülen noch weitere Vorteile, wie die Echtzeitdetektion, die Reduktion des Probenvolumens und die Verringerung der benötigten Sequenzierungsreagenzien.<sup>[182,189]</sup> Außerdem spielt hier eine Asynchronität der Verlängerung der unterschiedlichen Primer keine Rolle, da ohnehin jedes Molekül einzeln analysiert wird. Die Realisierung der Sequenzierung von Einzelmolekülen stellt vor allem große Anforderungen an das Detektionssystem. Es existieren allerdings einige Methoden, welche die Detektion einzelner DNA-Moleküle bereits nutzen. Dazu gehören sowohl etablierte und bereits kommerziell angewendete Methoden, als auch neue, vielversprechende Ansätze.<sup>[182,189]</sup> Die bisher entwickelten Methoden können in nicht Fluoreszenz-basierte und Fluoreszenz-basierte eingeteilt werden. Zu den nicht Fluoreszenz-basierten Ansätzen gehören vor allem die Sequenzierung mit Hilfe von Nanoporen<sup>[210-213]</sup> aber auch eine Reihe neuerer Ansätze

basierend auf Transmissionselektronenmikroskopie oder Raman-Spektroskopie.<sup>[189]</sup> Zu den Fluoreszenz-basierten Methoden gehören beispielsweise der exonukleolytische Abbau von Fluoreszenz-markierten DNA-Strängen<sup>[214-217]</sup> und das *Sequenzierung durch Synthese* mit Einzelmoleküldetektion.<sup>[218-220]</sup>

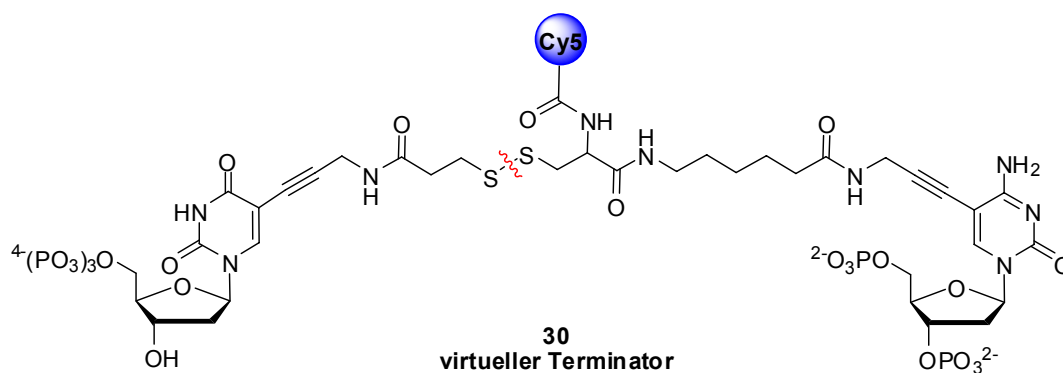
Die erste Methode basierend auf einem *Sequenzierung durch Synthese*-Ansatz mit einzelnen DNA-Molekülen wurde 2003 von *Braslavsky et al.* veröffentlicht.<sup>[218]</sup> Zur Detektion wurde hier der Fluoreszenz Energietransfer (FRET) zwischen den Farbstoffen Cy3 und Cy5 ausgenutzt. Die Fluoreszenzfarbstoffe wurden mit einem Totalreflexionsfluoreszenzmikroskop angeregt und die Strahlung mit einer CCD-Kamera detektiert. Die so erhaltenen Sequenzen stellten allerdings nur einen Fingerabdruck der Templatsequenz dar, da nur zwei der vier Nukleotide bestimmt wurden. Die Detektion der einzelnen Moleküle war nur durch den Einsatz der FRET-Technologie möglich, da dadurch die Hintergrundsignale deutlich reduziert werden konnten. Allerdings limitiert das gleichzeitig auch die Leselänge auf ca. 15 bp, was ein Nachteil dieser Methode darstellt. Weitere Nachteile sind die Detektion von Homopolymeren und die Reduktion der Polymeraseaktivität durch die am eingebauten Nukleotid verbleibenden, deaktivierten Fluoreszenzfarbstoffe.<sup>[218]</sup> Trotzdem wurde, basierend auf diesen ersten Arbeiten, durch die Firma *Helicos* der erste auf Einzelmoleküldetektion basierte Sequenzierer (*HeliScope<sup>TM</sup>*) entwickelt und vermarktet. Das Prinzip dieser weiterentwickelten und verbesserten Methode ist in Abbildung 3-18 gezeigt.<sup>[221,222]</sup>



**Abbildung 3-18:** Prinzip des *HeliScope<sup>TM</sup>* Sequenzierers.

Die Immobilisierung der Template erfolgt hier über die Hybridisierung an einen immobilisierten Poly(T)-Primer. Die Template werden dazu nach dem Schneiden und

Denaturieren mit Hilfe der Terminal Transferase polyadenyliert, wobei das letzte Adenosin einen Cy3-Farbstoff trägt. Dadurch werden die Template nach der Immobilisierung auf dem Träger lokalisiert (①). Der Cy3-Farbstoff wird dann chemisch abgespalten bevor mit den Sequenzierungszyklen begonnen wird. Zur Verlängerung des Primers durch die DNA-Polymerase werden hier so genannte virtuelle Terminatoren eingesetzt. In Abbildung 3-19 ist die Struktur dieser Terminatoren am Beispiel des dUTP-Cy5-Terminators **30** gezeigt.

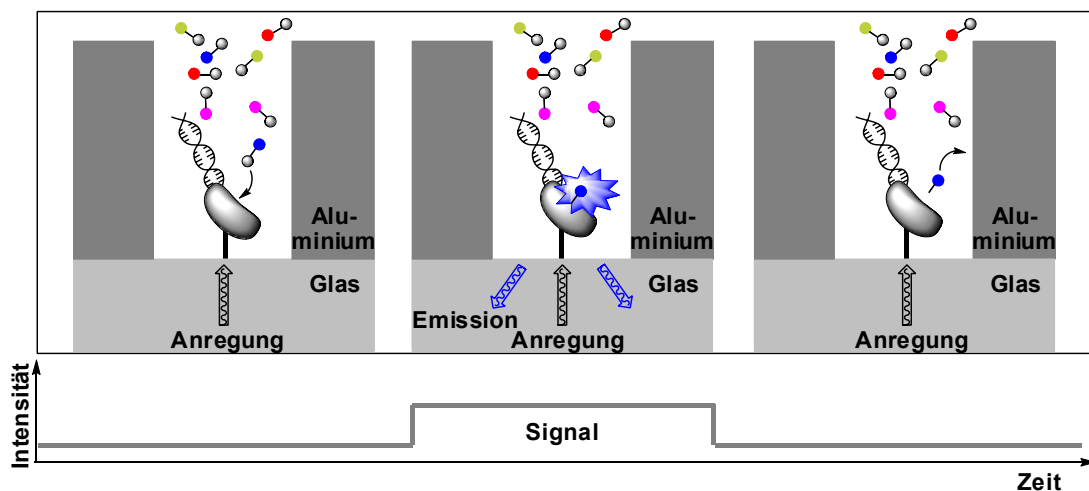


**Abbildung 3-19:** Struktur der virtuellen Terminatoren am Beispiel des dUTP-Cy5-Terminators **30**.<sup>[222]</sup>

Die virtuellen Terminatoren besitzen eine freie 3'-OH-Funktion, stoppen aber aufgrund des sterisch anspruchsvollen Rests an der Baseneinheit trotzdem die Polymerasereaktion. Der Rest besteht zum einen aus dem Farbstoff Cy5, der zur Detektion des Einbaus dient und dem 2'-Desoxycytidin-5'-3'-bis(monophosphat), das hauptsächlich zu den terminierenden Eigenschaften beiträgt.<sup>[222]</sup> Diese Reste werden nach dem Einbau und der Detektion durch reduktive Spaltung der Disulfidgruppe entfernt. In jedem Zyklus aus Einbau, Detektion und Spaltung wird jeweils nur ein Nukleotid eingesetzt. Die Verwendung dieser virtuellen Terminatoren löst sowohl das Problem der Detektion von homopolymeren Bereichen, als auch die Reduktion der Polymeraseaktivität aufgrund des am Nukleotid verbleibenden Farbstoffs (siehe Seite 41). Es wird außerdem auf die Detektion mittels FRET verzichtet und jedes der vier Nukleotide direkt detektiert. Das ermöglicht längere Leselängen von 25-30 Basenpaaren und es werden die kompletten Sequenzen der Template analysiert und nicht nur ein, aus zwei Basen bestehender, Fingerabdruck. Die Detektion erfolgt analog der ersten Version der Methode. Es wurden allerdings spezielle Reagenzien entwickelt, die die Fluoreszenz verstärken und das Ausbleichen der Farbstoffe verhindern. Außerdem muss

zusätzlich auf besondere Reinheit der verwendeten Reagenzien und Materialien geachtet werden, um die Hintergrundfluoreszenz möglichst komplett zu eliminieren.<sup>[221]</sup> Der *HeliScope*<sup>TM</sup> Sequenzierer generiert mehr als 45 Millionen Basen pro Stunde und wurde erfolgreich zur Quantifizierung eines Hefetranskripts,<sup>[223]</sup> zur Resequenzierung des M13 Virusgenoms<sup>[224]</sup> und zur Sequenzierung eines kompletten humanen Genoms eingesetzt.<sup>[225]</sup>

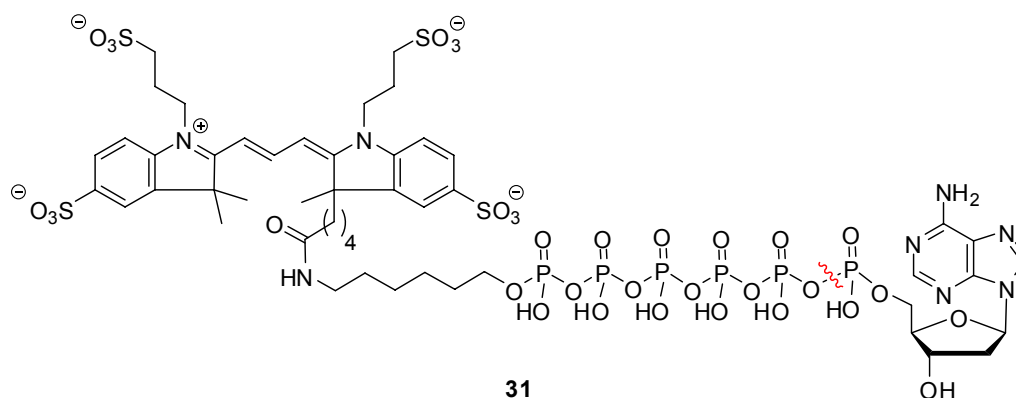
Das Prinzip des *HeliScope*<sup>TM</sup> Sequenzierers basiert auf einem zyklischen Einbau der vier Nukleotide nacheinander und benötigt daher viele, sehr gründliche Waschschritte. Die Weiterentwicklung davon, zur Verringerung der Zeit und der benötigten Reagenzien, wäre eine Echtzeitsequenzierung aller vier Nukleotide ohne Unterbrechung. Einen solchen Ansatz verfolgt die Firma *Pacific Biosciences*. Das Prinzip ist in Abbildung 3-20 schematisch dargestellt.<sup>[220,226,227]</sup>



**Abbildung 3-20:** Prinzip der Sequenzierung einzelner DNA-Moleküle in Echtzeit.<sup>[189]</sup>

Der Kern dieser Methode ist die Verwendung von Nullmode-Lichtwellenleitern (*zero-mode waveguides*, *ZMW*). Das ermöglicht die Detektion in einem Volumen von 20 zL ( $10^{-21}$  L) bei einer hohen Konzentration an Nukleotiden. Alternative Methoden, wie die Totalreflexionsmikroskopie nutzen Beobachtungsvolumina im Femtoliter Bereich ( $10^{-18}$ ) und benötigen piko- ( $10^{-12}$ ) bis nanomolare ( $10^{-9}$ ) Konzentrationen an Fluorophor, um einzelne Moleküle in Lösung zu detektieren. Polymerasen arbeiten allerdings erst bei mikromolaren Konzentrationen ( $10^{-6}$ ) der Substrate effektiv und das wird hier durch die Reduktion des Reaktionsvolumens erreicht. Der Aufbau besteht aus einem Metallfilm (Aluminium) mit Kavitäten, der auf einem Quarzdeckglas angeordnet

ist. Die Kavitäten werden von unten kontinuierlich mit zwei Lasern bestrahlt und in jeder ist ein DNA-Polymerasemolekül ( $\phi$ 29 Bakteriophagen Polymerase) immobilisiert. Der zum Templatstrang komplementäre Strang wird dann von der Polymerase in Anwesenheit aller vier, mit unterschiedlichen Farbstoffen markierten, Nukleotide synthetisiert. Da die Lichtintensität des Lasers im Hohlraum exponentiell abnimmt, wird nur der Farbstoff des Nukleotids detektiert, dass von der Polymerase eingebaut wird. In Abbildung 3-21 ist die Struktur der Fluoreszenz-markierten Nukleotide am Beispiel des 2'-Desoxyadenosinderivats **31** abgebildet.



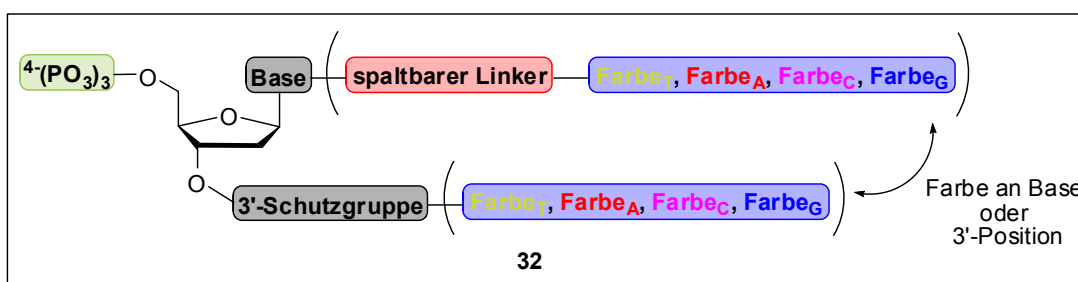
**Abbildung 3-21:** Struktur der im *Pacific Biosciences* System eingesetzten, Fluoreszenz-markierten Nukleotide am Beispiel des 2'-Desoxyadenosinderivats **31**.

Der Fluoreszenzfarbstoff ist über eine Hexaphosphateinheit an die 5'-Position angebunden. Beim Einbau des Nukleotids durch die Polymerase wird der Farbstoff abgespalten und es resultiert ein natürliches Nukleotid.

Die Methode wurde bisher an einem 158 Nukleotide langem Templatstrang demonstriert.<sup>[220]</sup> Nach Mittelung von 15 Sequenzierläufen konnte eine Lesegenauigkeit von 99.3 % erreicht werden, wobei die Geschwindigkeit, verglichen mit zyklisch arbeitenden Sequenzierern, um ca. das 10000fache gesteigert werden konnte. Es gibt bislang keine weiteren veröffentlichten Demonstrationen dieser Methode wie beispielsweise eine Resequenzierung eines Genoms. Sie scheint daher noch nicht ausgereift für die Anwendung in einem Sequenziergerät.

### 3.4.4 Träger-gestützte Sequenzierung durch Synthese mit reversiblen Terminatoren

Reversible Terminatoren sind definiert als Nukleotide, welche die Polymerasereaktion nach ihrem Einbau abbrechen, deren terminierende Eigenschaften aber leicht chemisch oder enzymatisch aufgehoben werden können.<sup>[228]</sup> Im ursprünglichen Sinn verstand man unter einem reversiblen Terminator, dass er eine reversibel blockierende Gruppe an der 3'-Hydroxyfunktion trägt. Wie die virtuellen Terminatoren bei dem *HeliScope*<sup>TM</sup> Sequenzierungssystem (siehe Kapitel 3.4.3) und auch andere Beispiele von *Metzker et al.*<sup>[229]</sup> oder *Turcatti et al.*<sup>[230]</sup> zeigen ist das nicht die einzige Methode, um einen Abbruch der Polymerasereaktion zu erreichen. Allerdings sind die 3'-blockierten, reversiblen Terminatoren die sicherste Methode, um einen definierten Einbau eines einzelnen Nukleotids zu erreichen und damit auch lange homopolymere Regionen sequenzieren zu können. Dieses Kapitel wird sich mit 3'-blockierten, reversiblen Terminatoren beschäftigen und auch im weiteren Verlauf der Arbeit sind mit reversiblen Terminatoren stets die reversibel 3'-blockierten Nukleotide gemeint. Ein reversibler Terminator besteht nicht nur aus einer 3'-blockierenden Gruppe, sondern muss einer ganzen Reihe an Anforderungen genügen. In Abbildung 3-22 ist die allgemeine Struktur **32** eines reversiblen Terminators mit zwei alternativen Möglichkeiten zur Farbstoffanbindung abgebildet.



**Abbildung 3-22:** Allgemeine Struktur eines reversiblen Terminators **32**.

Die erste Herausforderung besteht im Design einer reversibel blockierenden Gruppe an der 3'-Hydroxyfunktion, die folgende Anforderungen erfüllt:

- 1) Stabilität unter den Bedingungen der Polymerasereaktion
- 2) zuverlässiger Abbruch der Kettenverlängerung
- 3) quantitative Abspaltung zur Regeneration der freien OH-Gruppe unter milden Bedingungen

Die zweite Herausforderung ist das Auffinden einer DNA-Polymerase, welche die sterisch anspruchsvolleren, modifizierten Nukleotide akzeptiert. Um einen effektiven und selektiven Einbau aller vier Nukleotide zu erreichen, ist meist eine Optimierung der Polymerase durch ortsspezifische Mutagenese (*site-directed mutagenesis*)<sup>[231]</sup> oder gezielte Evolution (*directed evolution*)<sup>[232]</sup> notwendig. Darüber hinaus wird die Wahl der 3'-blockierenden Gruppe aufgrund katalytischer Eigenschaften einiger DNA-Polymerasen, die 3'-Ester oder -Amide spalten können, beschränkt. Diese Fähigkeiten von Polymerasen chemische Gruppen wie Ester oder Amide zu spalten werden als editierende Eigenschaften bezeichnet.<sup>[233]</sup>

Die dritte Herausforderung ist die Anbindung des Fluorophors, der zur Identifikation des eingebauten Nukleotids benötigt wird, dann aber wie die 3'-blockierende Gruppe abspaltbar sein muss. Hier gibt es prinzipiell zwei Möglichkeiten:

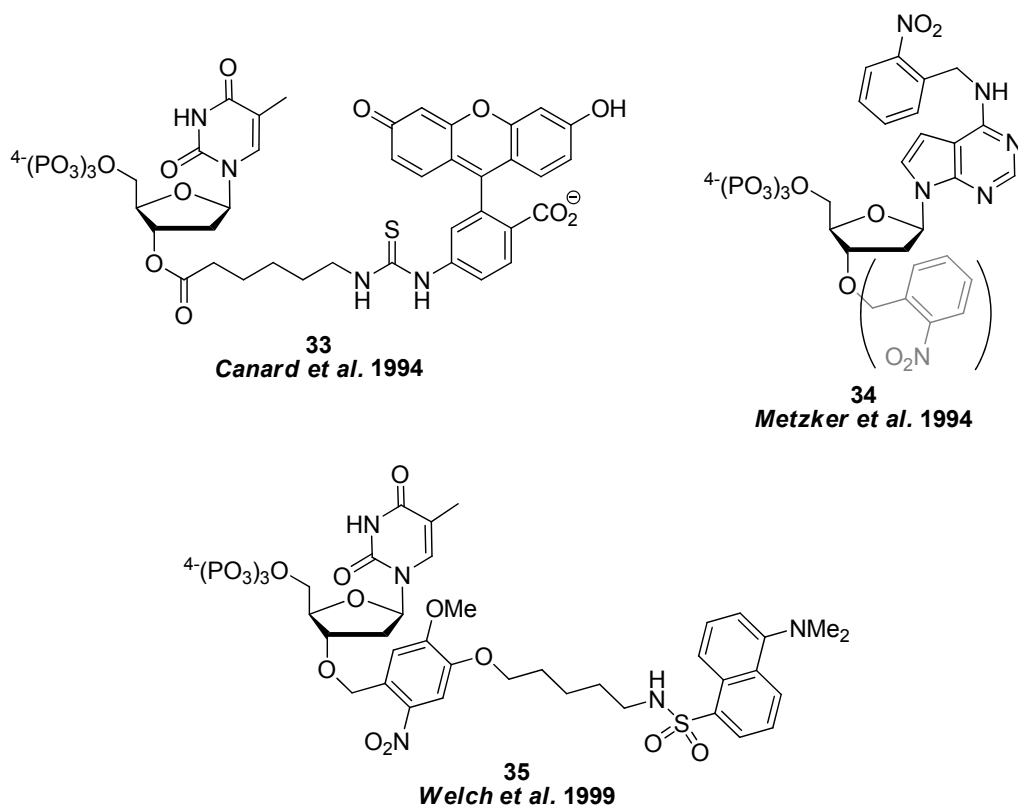
- 1) Anbindung über einen spaltbaren Linker an die Base
- 2) Verwendung der 3'-terminierenden Gruppe als Linker für den Farbstoff

Vorteile der ersten Möglichkeit sind die existierenden Erfahrungen bezüglich der Kupplungschemie an der Base und die von der Sanger-Sequenzierung her bekannte Akzeptanz solcher Nukleotide durch DNA-Polymerasen. Nachteile sind die aufwendigere Synthese und die zusätzliche Entwicklung eines Linkers, der unter den Bedingungen der 3'-blockierenden Gruppe spaltbar ist. Vorteil der zweiten Anbindungsmethode ist die automatische Abspaltung des Fluoreszenzfarbstoffs durch die Regenerierung der freien 3'-Hydroxygruppe. Problematisch könnten hier die Auffindung einer DNA-Polymerase sein, die eine solche 3'-Modifikation akzeptiert.

Um ein effektives und praktikables Sequenzierungssystem zu erhalten müssen mindestens zehn vollständige Zyklen ohne große Verluste durch unvollständige Reaktionsschritte möglich sein. Es wird also ein hoher Anspruch an die Ausbeuten der Polymerase- und die Spaltungsreaktionen gestellt.

Erste Untersuchungen von 3'-modifizierten Nukleotiden bezüglich ihrer Eignung als reversible Terminatoren stammen aus den 1990er Jahren von *Canard et al.*,<sup>[234]</sup> *Metzker et al.*<sup>[235]</sup> und *Welch et al.*<sup>[236]</sup> Die untersuchten 3'-Modifikationen sind in Abbildung 3-23 gezeigt.



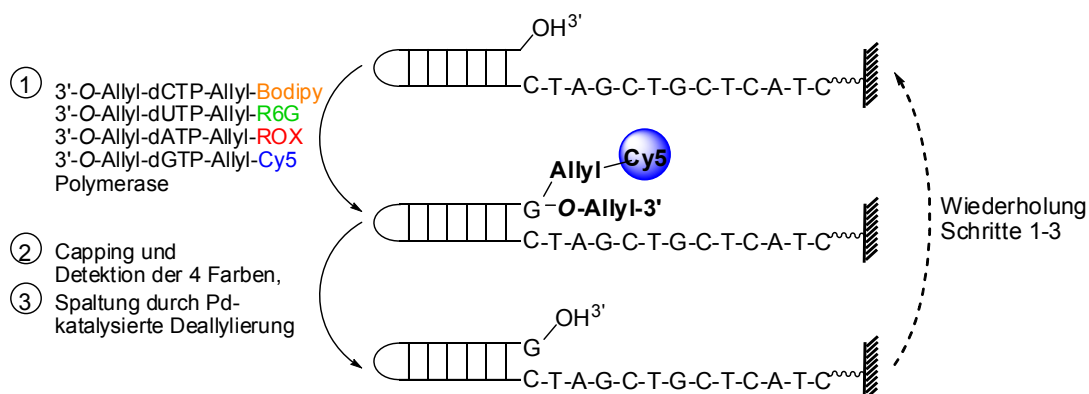


**Abbildung 3-23:** Erste 3'-Modifikationen, die zur Anwendung in reversiblen Terminatoren untersucht wurden.

*Canard et al.* konnten das 3'-modifizierte Derivat **33** mittels einer modifizierten T7 DNA-Polymerase erfolgreich in einen Primer einbauen und es fand auch eine Terminierung statt. Allerdings war der Einbau des gezeigten Fluorescein-markierten Nukleotids **33** im Vergleich zu anderen getesteten Modifikationen deutlich ineffektiver.<sup>[234]</sup> Des Weiteren wurde mit manchen verwendeten Polymerasen (z. B. Sequenase) eine Hydrolyse der Esterverknüpfung und damit eine unerwünschte Mehrfachinkorporation beobachtet. Ebenfalls 1994 wurde von *Metzker et al.* eine Studie mit mehreren unterschiedlichen 3'-Modifikationen wie Acetyl, Allyl, 2-Nitrobenzyl oder Tetrahydropyranyl veröffentlicht. Die photolabile 2-Nitrobenzylgruppe zeigte dabei die besten Eigenschaften. Sie wurde von mehreren thermostabilen DNA-Polymerasen akzeptiert und konnte die Polymerasereaktion terminieren.<sup>[235]</sup> Allerdings stellte sich 13 Jahre später heraus, dass die 1994 angenommene Struktur falsch war. Es handelte sich nicht um das 3'-O-(2-Nitrobenzyl) modifizierte Nukleotid, sondern um das N<sup>6</sup>-alkylierte Nukleotid **34** (schwarze Struktur in Abbildung 3-23).<sup>[229]</sup> Das 1999 von *Welch et al.* untersuchte Dansyl-markierte Nukleotid **35** konnte aufgrund mangelnder Akzeptanz nicht erfolgreich in einen Primer eingebaut werden.<sup>[236]</sup>

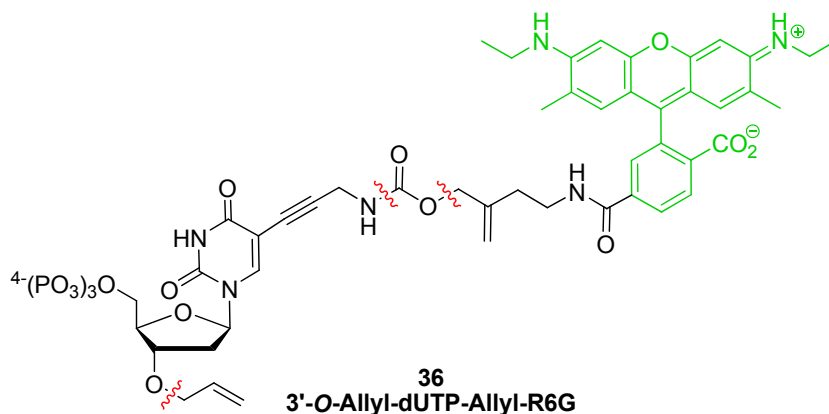
Vor allem die Ergebnisse der Polymeraseakzeptanz dieser drei Verbindungen gaben Aufschluss über die strukturellen Möglichkeiten, die bei der Entwicklung von reversiblen Terminatoren gegeben sind. Zusammenfassend ist daher zu sagen, dass sterisch anspruchsvolle 3'-Modifikationen schlecht oder gar nicht durch DNA-Polymerasen toleriert werden. Diese Schlussfolgerung wird auch durch die Untersuchung der Kristallstruktur eines Komplexes aus einer Ratten-DNA-Polymerase  $\beta$ , eines DNA-Primers und eines Nukleotids (ddCTP) bestätigt (siehe auch Kapitel 3.4.4.1, Seite 55 bis 57).<sup>[237]</sup> Die Konsequenzen daraus sind zum einen die Notwendigkeit eine möglichst kleinen 3'-blockierenden Gruppe zu finden und zum anderen die Anbindung des sterisch anspruchsvollen Farbstoffs über einen spaltbaren Linker an die Baseneinheit. Bei der Sanger Sequenzierung haben sich die 5-Position bei Pyrimidinen und die 7-Position bei Purinen für die Anbindung des Farbstoffs bereits bewährt.<sup>[36,238]</sup>

In den letzten fünf bis zehn Jahren wurde die Entwicklung von reversiblen Terminatoren für die Anwendung in Träger-gestützten Sequenzierungssystemen sowohl von der industriellen, als auch von der akademischen Seite vorangetrieben. Dabei sind von der akademischen Seite vor allem die Arbeiten der Gruppe um *Prof. Jingyue Ju* von der *Columbia University* in New York zu erwähnen.<sup>[239,240]</sup> Als reversible 3'-Modifikationen untersuchten sie vor allem die Allylgruppe. Sie entwickelten außerdem einen photospaltbaren Linker auf der Basis der 2-Nitrobenzylgruppe<sup>[241-243]</sup> und einen Palladium-spaltbaren Allyl-Linker.<sup>[244,245]</sup> Es wurde sowohl Fluoreszenz-markierte, reversible 3'-O-Allyl-Terminatoren in Kombination mit den photospaltbaren Linker,<sup>[246,247]</sup> als auch mit dem Palladium-spaltbaren Linker synthetisiert.<sup>[244,245]</sup> Im Fall der reversiblen Terminatoren mit der 3'-O-Allylgruppe und dem Allyl-Linker sind beide Modifikationen unter den gleichen Bedingungen spaltbar. Sie stellen die erste Generation reversibler Terminatoren von *Ju et al.* dar, mit denen eine erfolgreiche, erste Sequenzierung von 13 Nukleotiden an immobilisierten Hairpin-Templaten durchgeführt werden konnten. Das Prinzip der geträgerten, zyklischen Sequenzierung mit reversiblen Terminatoren ist in Abbildung 3-24 dargestellt.



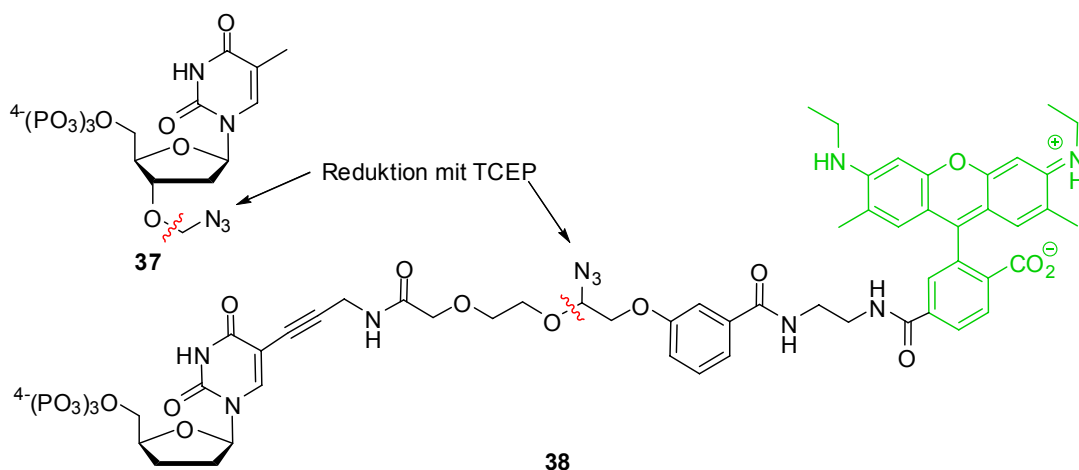
**Abbildung 3-24:** Prinzip der geträgerten, zyklischen Sequenzierung durch Synthese mit reversiblen Terminatoren der ersten Generation von Ju et al..<sup>[245]</sup>

Die 5'-Azido modifizierten Hairpin-Templates wurden hier über eine „Click“-Reaktion an die Alkin-funktionalisierte Glasoberfläche angebunden.<sup>[242]</sup> Der erste Schritt des Sequenzierungszyklus (①) ist die Zugabe aller vier 3'-O-Allyl modifizierten und mit einem spezifischen Farbstoff markierten Nukleotide sowie einer mutierten 9°N DNA-Polymerase. Die Inkubation erfolgt bei 68 °C für zehn Minuten. Der Schritt ② besteht zunächst aus einer „Capping“ Reaktion. Da hier keine einzelnen Moleküle detektiert werden ist die Synchronität der Verlängerung von großer Bedeutung. Dies erfolgt mit den vier unmarkierten, 3'-O-Allyl modifizierten Nukleotiden. So bleiben die im ersten Schritt nicht verlängerten Primer nach der Abspaltung der Allylgruppen für eine weitere Verlängerung verfügbar. Nach der „Capping“ Reaktion werden die vier Farbstoffe detektiert. Aus der Anzeige des Fluoreszenzscanners kann die Sequenz direkt abgelesen werden. Der dritte Schritt (③) ist dann die Abspaltung der 3'-O-Allylgruppe und des Farbstoffs. Dies erfolgt in zwei Schritten. Zuerst wird die Oberfläche für fünf Minuten bei 60 °C mit einer Palladium enthaltenden Lösung (Thermopol I Puffer / Na<sub>2</sub>PdCl<sub>4</sub> / P(PhSO<sub>3</sub>Na)<sub>3</sub>) inkubiert. Anschließend wird der Träger mit 3 M Tris·HCl-Puffer (pH = 8.5) bei 60 °C für weitere fünf Minuten behandelt, um den im ersten Schritt gebildeten Palladium Komplex zu spalten und die freie 3'-Hydroxygruppe zu regenerieren. Die weiteren Zyklen bestehen dann aus der Wiederholung der beschriebenen Schritte ① - ③ (siehe Abbildung 3-24). In Abbildung 3-25 ist die Struktur der verwendeten Allyl-Terminatoren am Beispiel des 2'-Desoxyuridinderivats 36 gezeigt.



**Abbildung 3-25:** Struktur der von *Ju et al.* verwendeten Terminatoren am Beispiel des 2'-Desoxyuridinderivats **36**.<sup>[245]</sup>

Die Spaltungsstellen sind rot gekennzeichnet. Die Spaltung des Linkers erfolgt mit Palladium an der allylischen Struktureinheit und anschließender Freisetzung von Kohlendioxid. Es bleibt ein Propargylaminrest am eingebauten Nukleotid zurück. Als problematisch für längere Leselängen hat sich bei diesem System die Abnahme des Fluoreszenzsignals des eingebauten Nukleotids gegenüber dem Hintergrundsignal herausgestellt. Einer der Hauptgründe dafür wird in der Verlangsamung des Einbaus der Nukleotide durch die Polymerase aufgrund der am Nukleotid verbleibenden Propargylamineinheit gesehen. *Ju et al.* haben daher eine Hybridtechnologie aus Sanger Sequenzierung und der *Sequenzierung durch Synthese* mit reversiblen Terminatoren entwickelt. Die hier verwendete Chemie basiert auf der Azidomethylgruppe als 3'-blockierende Gruppe und einem Azido-Linker zur Anbindung des Farbstoffs, der unter den gleichen Bedingungen mit Tris-(2-carboxyethyl)phosphan (TCEP) spaltbar ist.<sup>[248]</sup> Die Nukleotidmischung besteht aus den in Abbildung 3-26 gezeigten Komponenten.

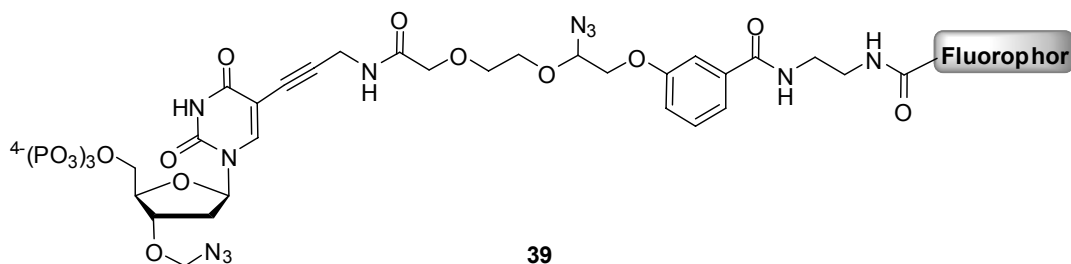


**Abbildung 3-26:** Zweite Generation reversibler Terminatoren von *Ju et al.* zur *Sequenzierung durch Synthese*, als Beispiele sind das 2'-Desoxythymidinderivat **37** und das 2',3'-Dideoxyuridinderivat **38** gezeigt.<sup>[248]</sup>

Hier wird die Primerverlängerung mit einer Mischung aus 3'-Azidomethyl-modifizierten, unmarkierten Nukleotiden und an der Base über einen Azido-Linker Farbstoff-markierten 2',3'-Didesoxynukleotiden durchgeführt. Die Fluoreszenz-markierten Nukleotide sind dabei in einem geringeren Anteil vorhanden. Die Identifikation des eingebauten Nukleotids erfolgt dann über die eingebaute Fraktion der markierten 2',3'-Dideoxynukleotide. Die anderen Primer werden mit den unmarkierten reversiblen Terminatoren verlängert. Die Spaltung des Linkers und der 3'-Modifikation erfolgt durch Reduktion mit TCEP und anschließender Hydrolyse. Danach werden die Primer mit dem störenden Rest an der Base nicht weiter verlängert und die Polymerasereaktion findet nur an den Primern mit natürlichen Nukleotiden statt. Da die Fraktion der verlängerbaren Primer immer geringer wird, muss die Konzentration an Fluoreszenz-markierten 2',3'-Dideoxynukleotiden im Verlauf der Sequenzierung angepasst werden. Mit dieser Methode konnte eine erste erfolgreiche Sequenzierung von 32 Nukleotiden an immobilisierten Hairpin-Templaten durchgeführt werden.<sup>[248]</sup>

Ein erstes kommerzielles Produkt (*Genome Analyzer*), dass die *Sequenzierung durch Synthese* Technologie nutzt, wurde 2006 von *Solexa* (heute *Illumina*) eingeführt. Die Blockierung der 3'-Hydroxygruppe basiert hier ebenfalls auf der Azidomethylgruppe. In einem Patent aus dem Jahr 2004 von *Solexa* wurde die Anbindung des Fluorophors über einen Linker mit spaltbarer Disulfidgruppe beschrieben.<sup>[249]</sup> Diese erste Generation reversibler Terminatoren hatte daher den Nachteil dass zwei Spaltungsschritte mit

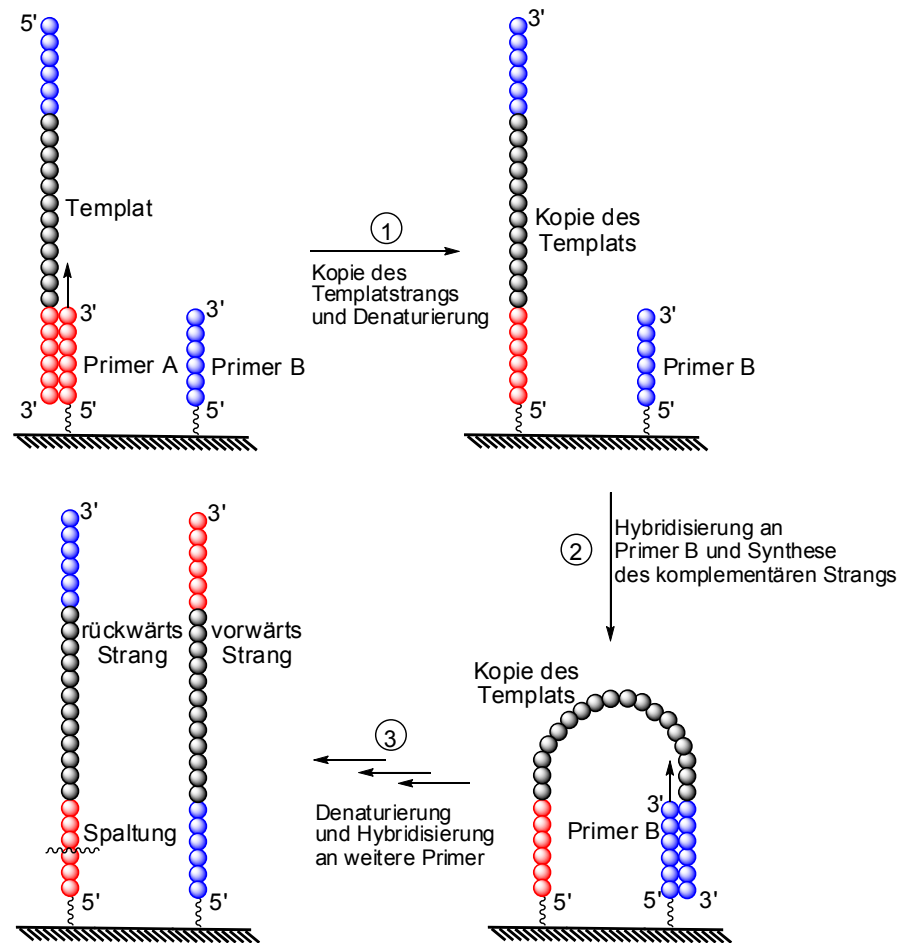
unterschiedlichen Reagenzien zur Deblockierung der 3'-Hydroxygruppe und Abspaltung des Farbstoff notwendig waren. In einer neueren Publikation aus 2008 wird als Linker ebenfalls der, von *Ju et al.* verwendete, Azido-Linker beschrieben.<sup>[250]</sup> Dieser ist unter den gleichen Bedingungen wie die 3'-Modifikation spaltbar. Die Struktur der verwendeten, reversiblen Terminatoren ist in Abbildung 3-27 am Beispiel des 2'-Desoxyuridderivats **39** gezeigt.



**Abbildung 3-27:** Reversible Terminatoren für den *Genome Analyzer* von *Illumina* am Beispiel des 2'-Desoxyuridderivats **39**.<sup>[250]</sup>

Die Spaltung mit TCEP erfolgt hier analog der in Abbildung 3-26 gezeigten. Das Sequenzierungsprinzip des *Genome Analyzers* entspricht dem in Abbildung 3-24, am Beispiel der reversiblen Terminatoren von *Ju et al.*, erläuterten Ablauf. Das Gerät besteht aus einem optisch transparenten Träger mit acht Reihen zur Immobilisierung von Templaten. Die Anregung der Fluoreszenzfarbstoffe erfolgt hier wie bei der Einzelmolekülsequenzierung mittels evaneszenter Wellen, die durch Totalreflexionsmikroskopie erzeugt werden. Für die Detektion dient wie in den meisten anderen Methoden eine CCD-Kamera.

Besonders ist bei diesem Sequenzierungssystem die Amplifizierung der DNA-Template, die *in situ* durch „Brücken“ Amplifizierung erfolgt.<sup>[250,251]</sup> In Abbildung 3-28 ist das Prinzip dieser Amplifikation gezeigt.



**Abbildung 3-28:** Amplifikationsprinzip des *Genome Analyzers*.<sup>[188,250]</sup>

Die zu sequenzierende DNA wird zerkleinert und mit zwei Adaptoren modifiziert. Über die Adapter erfolgt die Immobilisierung der Template durch Hybridisierung an die auf dem Träger gebundenen Primer (Primer A, Primer B). In Schritt ① wird mittels der *Taq* Polymerase der komplementäre Templatstrang ausgehend von dem immobilisierten Primer (hier Primer A) synthetisiert, der Doppelstrang denaturiert und das ursprüngliche Templat entfernt. In Schritt ② findet dann eine Hybridisierung an einen passenden, benachbarten Primer (hier Primer B) statt. Es entsteht eine Brücke an der, ausgehend von dem neuen Primer B, der komplementäre Strang (ursprünglicher Templatstrang) mittels der *Bst*(*Bacillus stearothermophilus*)-Polymerase synthetisiert wird. In Schritt ③ findet wieder eine Denaturierung statt und die Schritte ① - ③ werden 35 Mal wiederholt. Nach beendeter Amplifizierung werden alle an den Primer A gebundenen rückwärts Stränge (bezogen auf das ursprüngliche Templat) durch eine Behandlung mit Periodat gespalten, so dass die Sequenzierung nur mit den vorwärts Strängen

stattfindet. Durch die „Brücken“ Amplifikation entstehen Cluster mit ca. 1000 klonierten DNA-Molekülen. Es können bis zu  $50 \times 10^6$  Cluster pro Flusszelle generiert werden. Die Leselänge des Systems beträgt 25-36 Basen, somit können pro Sequenzierungszyklus mit  $50 \times 10^6$  Clustern über eine Milliarde Basen sequenziert werden. Ein Sequenzierungszyklus dauert ca. zweieinhalb Tage, was die Methode deutlich langsamer macht, als beispielsweise das Pyrosequenzieren (500 Mio. bp/10 Stunden). Weitere Probleme treten bei größeren Leselängen in der Genauigkeit der Basenidentifikation auf. Das kann durch eine zu geringe Inkorporation oder durch Mehrfacheinbau hervorgerufen werden. Auch die Entschützung der 3'-Hydroxygruppe verläuft nicht immer vollständig. All diese Faktoren bedingen eine heterogene Population innerhalb eines Clusters und sind der Grund für die vergleichsweise kurzen Leselängen.<sup>[188,240]</sup> Eine Reihe von Verbesserungen sind noch im Gange<sup>[252,253]</sup> aber trotzdem hat sich der *Genome Analyzer* bereits als Sequenzierer der zweiten Generation etabliert und es wurde neben vielen anderen Anwendungen<sup>[254-256]</sup> auch ein komplettes humanes Genom mit diesem System sequenziert.<sup>[250]</sup>

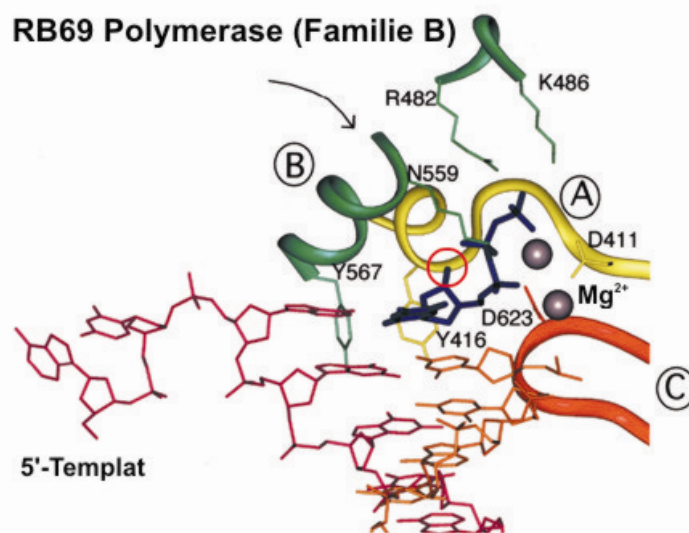
#### **3.4.4.1 Eigenschaften von DNA-Polymerasen**

Da die Identifizierung und Optimierung einer geeigneten DNA-Polymerase ein Kernpunkt bei der *Sequenzierung durch Synthese* mit reversiblen Terminatoren ist, soll hier kurz auf einige Eigenschaften von DNA-Polymerasen näher eingegangen werden.

Die primäre Aufgabe von DNA-Polymerasen ist die Replikation des Genoms zur Erhaltung der genetischen Information und zu ihrer Weitergabe über Generationen. Diese Aufgabe wird erschwert durch die enorme Größe des Genoms von ca. drei Milliarden Basenpaaren und seine andauernde Beschädigung durch endogene oder umgebungsbedingte Einflüsse. Daher ist es notwendig, dass DNA-Polymerasen neben der Katalyse des Nukleotidyltransfers eine Reihe weiterer Funktionen zur Reparatur und Erhaltung des Genoms besitzen. Das beinhaltet vor allem 3'-5'-Exonuklease- (*proofreading*), Mismatch Reparatur-, RNase H-, Translase- und weitere editierende Aktivitäten.<sup>[233,257-259]</sup> Prinzipiell werden DNA-Polymerasen in fünf Klassen eingeteilt (A, B, C, X und Y).<sup>[260]</sup> Diese Einteilung basiert hauptsächlich auf ähnlichen katalytischen Eigenschaften und Primärsequenzen. Informationen über den Mechanismus der DNA-Synthese konnten durch eine Reihe von Kristallstrukturen von DNA-Polymerase/DNA/Nukleotid-Komplexen erhalten werden. Mittlerweile sind



Kristallstrukturen von Vertretern aller Polymerasefamilien zugänglich.<sup>[237,259,261-268]</sup> Die erste Kristallstruktur eines Polymerase/Nukleotid-Komplexes war 1985 die des Klenow-Fragments der *E. coli* Polymerase I mit dTMP.<sup>[261]</sup> Obwohl keine große sequenzielle Ähnlichkeit zwischen den Polymerasen unterschiedlicher Familien besteht, ist der Mechanismus der DNA-Synthese und die Tertiärstruktur des aktiven Zentrums sehr einheitlich. Die Tertiärstruktur des aktiven Zentrums ähnelt einer rechten Hand, bei der die drei Einheiten „Daumen“, „Finger“ und „Handfläche“ unterschieden werden. Der Mechanismus basiert im Wesentlichen auf zwei zweiwertigen Metallionen (meist  $Mg^{2+}$ ). In Abbildung 3-29 ist ein Ausschnitt aus der RB69 Bakteriophagen Polymerase (Familie B) gezeigt.<sup>[268]</sup>

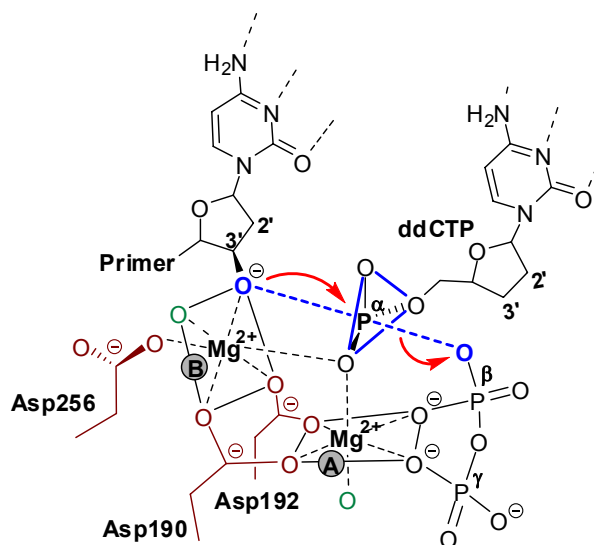


**Abbildung 3-29:** Ausschnitt aus der RB69 Bakteriophagen Polymerase B. Blau: Nukleotid; rot eingekreist: 3'-OH-Gruppe; graue Kugeln:  $Mg^{2+}$ -Ionen; roter DNA Strang: Templat; oranger DNA Strang: Primer; grün (B): Subdomänen des „Fingers“; gelb (A) und rot (C): katalytische Aminosäuren in der „Handfläche“ (Quelle: *Patel et al.*, 2001).<sup>[268]</sup>

Die „Handfläche“ (A) und (C) enthält das katalytisch aktive Zentrum mit den beiden Metallionen, die „Finger“-Domäne (B) bindet an das Nukleotid und an den einzelsträngigen Templatstrang. Der Bereich, der als „Daumen“ bezeichnet wird ist in Abbildung 3-29 nicht sichtbar, er bindet an Teile der doppelsträngigen DNA. Das Enzym wechselt bei der Kettenverlängerung von einer offenen in eine geschlossene Konformation, bei der sich die „Finger“-Domäne in Richtung der „Handfläche“ dreht, angedeutet durch den schwarzen Pfeil. Was hier gut zu sehen ist, ist dass sich das Nukleotid in einer hydrophoben Tasche befindet und vor allem die 3'-Hydroxygruppe (roter Kreis) sehr nah am peptidischen Rückgrat lokalisiert ist. Das bestätigt die

experimentellen Ergebnisse, dass sterisch anspruchsvolle Reste an der 3'-Position von den meisten DNA-Polymerasen nicht toleriert werden. Die wahrscheinlich wichtigste Eigenschaft einer Polymerase ist ihre Genauigkeit (*fidelity*). Die Wechselwirkungen, die zur Erkennung des falschen bzw. richtigen Nukleotids essentiell sind, sind noch nicht bis ins Detail verstanden. Jedoch konnten mit Hilfe der Kristallstrukturen viele Erkenntnisse gewonnen werden. So ist das Nukleotid zwar über Wasserstoffbrückenbindungen zum Templatstrang fixiert, sie tragen aber nicht in der Hauptsache zur Erkennung des komplementären Nukleotids bei. Diese Schlussfolgerung konnte aus Untersuchungen von *Kool et al.* zur Basenpaarung von universellen Nukleotiden im Vergleich zu natürlichen Nukleotiden gezogen werden.<sup>[269,270]</sup> Die wichtigste Rolle zur Diskriminierung der vier Nukleotide spielen konformationelle Veränderungen beim Eintritt des Nukleotids in das aktive Zentrum. Es bildet sich eine hydrophobe Tasche aus, welche die Baseneinheit und den Riboserest des Nukleotids umschließt und eine hydrophile Tasche, welche die Triphosphateinheit beherbergt. Diese präzise Anordnung von hydrophoben und hydrophilen Wechselwirkungen am Nukleotid und am Primer-Templat im Zusammenspiel mit den Wasserstoffbrückenbindungen scheint essentiell für die Genauigkeit einer Polymerase.<sup>[268]</sup> Einen weiteren Beitrag zur fehlerfreien Replikation leistet die, ebenfalls auf einem Mechanismus mit zwei Metallionen basierende, 3'-5'-Exonukleaseaktivität. Diese Korrektoreigenschaft besitzen allerdings nicht alle Polymerasen. Ein Beispiel einer Polymerase mit Exonukleaseaktivität ist die *E. coli* DNA-Polymerase I.<sup>[271-273]</sup> Ein Enzym, dem diese Eigenschaft fehlt ist beispielsweise die *Taq* DNA-Polymerase.<sup>[233]</sup>

Der Übergangszustand der Nukleotidyltransfer Reaktion konnte erstmals 1994 durch *Pelletier et al.* aus einer Kristallstruktur der Ratten Polymerase  $\beta$  mit einem Primer-Templat Strang und ddCTP als Nukleotid beobachtet werden. Eine höher aufgelöste Kristallstruktur der humanen Polymerase  $\beta$  mit ddCTP von 1997 konnte noch detailliertere Informationen bezüglich der Koordinationssphäre der beiden Magnesiumionen liefern und ist in Abbildung 3-30 gezeigt.<sup>[274]</sup>



**Abbildung 3-30:** Übergangszustand des Einbaus von ddCTP am aktiven Zentrum der humanen DNA-Polymerase  $\beta$ .<sup>[274]</sup> Blau: trigonal bipyramidaler Übergangszustand am  $\alpha$ -Phosphoratom des Triphosphats; braun: Asparaginsäurereste des aktiven Zentrums; grün: Wassermoleküle in der Koordinationssphäre der  $Mg^{2+}$ -Ionen.

Im aktiven Zentrum sind die beiden Magnesiumionen durch drei Asparaginsäurereste (D190, D192 und D256, braun) gebunden. Die Metallionen sind oktaedrisch koordiniert mit jeweils einem Wassermolekül (grün) um die Koordinationssphäre zu vervollständigen. Das Nukleotid ist über das pentakoordinierte  $\alpha$ -Phosphoratom an beide  $Mg^{2+}$ -Ionen (A und B) koordiniert. Mit Metallion A bildet es einen  $\alpha,\beta,\gamma$ -tridentaten Komplex, der die Abspaltung des Pyrophosphats unterstützt. Die 3'-Hydroxygruppe wird durch die Koordination mit dem Magnesiumion B aktiviert. Die Geometrie des pentakoordinierten  $\alpha$ -Phosphoratoms im Übergangszustand ist eine trigonale Bipyramide (blau), in der das 3'-Sauerstoffion und die Pyrophosphatgruppe die apikalen Positionen besetzen. Der Nukleotidyltransfer verläuft demnach nach einem konzertierten,  $S_N2$ -artigen Mechanismus.<sup>[274]</sup>

Für den Einsatz einer Polymerase in der *Sequenzierung durch Synthese* mit reversiblen Terminatoren sind einige Eigenschaften von Polymerasen wie die 3'-5'-Exonukleaseaktivität oder die Hydrolyse von 3'-Modifikationen (siehe Kapitel 3.4.4, Seite 47) problematisch. Die Exonukleaseaktivität kann relativ einfach durch gezielte Mutationen in der exonukleolytisch aktiven Domäne ausgeschaltet werden. Da die Bereiche der Polymerase, die für die editierenden Eigenschaften verantwortlich sind weniger gut untersucht sind, ist das Ausschalten dieser Aktivität schwieriger. Es gibt

auch Polymerasen, z. B. die *Taq* DNA-Polymerase, die weder eine 3'-5'-Exonukleaseaktivität, noch editierende Eigenschaften besitzen. Es bleibt aber auch dann eine große Herausforderung, eine Polymerase zu identifizieren, die 3'-Modifikationen akzeptiert und trotzdem in hohem Maße zwischen den Nukleotiden diskriminiert. In einer Studie mit 4'-Alkyl<sup>[275]</sup> oder 4'-Acyl<sup>[276]</sup> modifizierten Nukleotiden beobachteten *Marx et al.*, dass bei Polymerasen, die eine sehr enge Bindungstasche und damit eine hohe Genauigkeit aufweisen, die Inkorporation von modifizierten Nukleotiden zu einer Rasterverschiebung durch Deletion oder Insertion eines Nukleotids führen kann.<sup>[277]</sup> Dies zeigt die hohe Abhängigkeit der Selektivität einer Polymerase von sterischen Einflüssen.<sup>[275-278]</sup> Um die Eigenschaften von DNA-Polymerasen den Anforderungen anzupassen bedient man sich des kombinatorischen Enzymdesigns durch unterschiedliche Methoden wie gezielte Evolution oder ortsspezifische Mutagenese.<sup>[231,232,279]</sup> Durch ein entsprechendes Screening, z. B. dem Einbau von 3'-modifizierten Nukleotiden für das *Sequenzieren durch Synthese*, können dann die Kandidaten herausgefiltert werden, die die gewünschten Eigenschaften besitzen.

Die in Kapitel 3.4.4 besprochenen Anforderungen an reversible Terminatoren und die Diskussion der diversen Eigenschaften von DNA-Polymerasen in diesem Kapitel zeigen, dass die Entwicklung eines Systems zur *Sequenzierung durch Synthese* eine große Herausforderung ist. In dessen Mittelpunkt steht die Auffindung einer passenden Kombination aus reversiblen Terminator und DNA-Polymerase. Die bisherigen Möglichkeiten dieser Methode zeigen aber auch, dass es ein sehr interessanter Ansatz mit viel Potential ist und ermutigen dazu weitere Kandidaten für reversible Terminatoren zu erforschen und die Eigenschaften von DNA-Polymerasen zu verbessern.

### 3.4.5 Detektion von genetischen Variationen durch Minisequenzierung

Unter *Minisequenzierung*, auch als *Genotypisierung* bzw. *genotyping* bezeichnet versteht man im Allgemeinen die Verlängerung eines Primers um eine Base mit einem markierten Terminator. Diese Analyse wird hauptsächlich zur Detektion von genetischen Variationen einzelner Basen (SNPs) eingesetzt. Ein großes Projekt, dass sich mit der Auffindung und Dokumentation von SNPs im menschlichen Genom beschäftigt ist das internationale *HapMap-Projekt*.<sup>[48,280]</sup> Diese Variationen treten sehr häufig im humanen Genom auf, etwa alle 200 bis 1000 Basenpaare ist eine variable Position zu finden. Die Analyse dieser Variationen verspricht ein tieferes Verständnis ihres Einflusses auf die individuelle Resistenz oder Anfälligkeit gegenüber Krankheiten, den Erfolg medizinischer Behandlungen und medikamentöser Therapien. Daher erfolgte vor dem Hintergrund des *HGP* eine rasante Entwicklung von Technologien für das *Minisequenzieren*, von denen eine ganze Reihe kommerziell verfügbar ist.<sup>[281-283]</sup> Die Methoden, die auf der Verwendung von Mikroarrays basieren, haben dabei das größte Potential für eine kostengünstige Standardanwendung. Sie sind in der Lage gleichzeitig eine Vielzahl von Variationen zu analysieren. Unter den vielen Mikroarray-basierten Methoden<sup>[284-287]</sup> soll hier nur auf das bereits 1996 entwickelte und von *Asper Biotech* für diagnostische Dienstleistungen verwendete *APEX* System (*Arrayed Primer Extension*) näher eingegangen werden.<sup>[288-290]</sup> Das *APEX* System ist eine leistungsfähige Methode zur Detektion verschiedener Typen genetischer Variationen. Es kombiniert die Vorteile der Mikroarraytechnologie mit der gut bekannten Sanger Sequenzierung indem zur Strangterminierung Fluoreszenz-markierte 2',3'-Didesoxynukleotide verwendet werden.<sup>[290]</sup> Bei der *APEX* Methode werden hunderte bis tausende Primer auf einem Glasträger über ihr 5'-Ende immobilisiert und mit den Templatsequenzen hybridisiert. Für diagnostische Analysen werden die Primer so gewählt, dass die erste Position im einzelsträngigen Teil des Templats die zu untersuchende, variable Position darstellt. Die Primer werden dann am 3'-Ende mit einem Fluoreszenz-markierten 2',3'-Didesoxynukleotid durch eine Polymerasereaktion verlängert und der Träger mit einem Fluoreszenzdetektor analysiert. So lassen sich alle vier möglichen Sequenzvarianten an der untersuchten Position gleichzeitig und mit hoher Genauigkeit identifizieren.

Eine Limitierung der Methode ist die Tatsache, dass für jede zu sequenzierende Position ein Primer auf dem Träger benötigt wird. Vor allem schränkt das die Möglichkeit zu *de novo* Identifizierung von SNPs in kurzen, krankheitsrelevanten Gensequenzen ein. Die hohe Dichte an Primern, die dafür benötigt würde, kann Probleme bei der Fluoreszenzdetektion hervorrufen oder, je nach Länge des Genabschnitts, die Möglichkeiten des Systems übersteigen. An dieser Stelle ist Raum für Weiterentwicklungen, um die Anwendungsmöglichkeiten des *APEX* Systems zu erweitern. Ein Ansatz, der das Potential hat diese Technologie entscheidend weiterzuentwickeln, ist die Kombination des *APEX* Systems mit der *Sequenzierung durch Synthese* unter Verwendung reversibler Terminatoren. Das eröffnet die Möglichkeit, die Anzahl der benötigten Primer entsprechend der Anzahl der durchgeführten Sequenzierungszyklen zu reduzieren. Diese Idee wurde im Rahmen des EU-Projekts „ArraySBS“, an dessen Ergebnis diese hier vorgestellte Arbeit maßgeblich beteiligt ist, verfolgt. Das EU-Projekt wird im folgenden Kapitel näher vorgestellt.

### 3.5 Das „ArraySBS“-EU Projekt

Das EU-Projekt COOP-CT-2005 - 017623 „ArraySBS“ („Array based Sequencing-by-Synthesis“) wurde im August 2005 gestartet und durch die EU finanziert. Die Arbeitsgemeinschaft bestand aus drei wissenschaftlichen (*Universität Frankfurt*, *Universität Tartu* und *Silex Microsystems AB*) und drei industriellen Partnern (*Fermentas UAB*, *Asper Biotech* und *Quiatech AB*). Die Zusammenarbeit verlief über drei Jahre. Das Ziel des Projekts war die Entwicklung eines *Sequenzierung durch Synthese*-Konzepts sowie der Nachweis der Durchführbarkeit (*proof-of-principle*) an immobilisierten Primern, die am 3'-Ende mit den neuen, reversiblen Terminatoren verlängert werden sollten.

Die grundlegende Idee der Anwendungsmöglichkeit der entwickelten, reversiblen Terminatoren besteht in der Weiterentwicklung des von *Asper Biotech* verwendeten *APEX* Genotyping-Systems (siehe Kapitel 3.4.5).

Das Projekt wurde in fünf Hauptziele unterteilt:

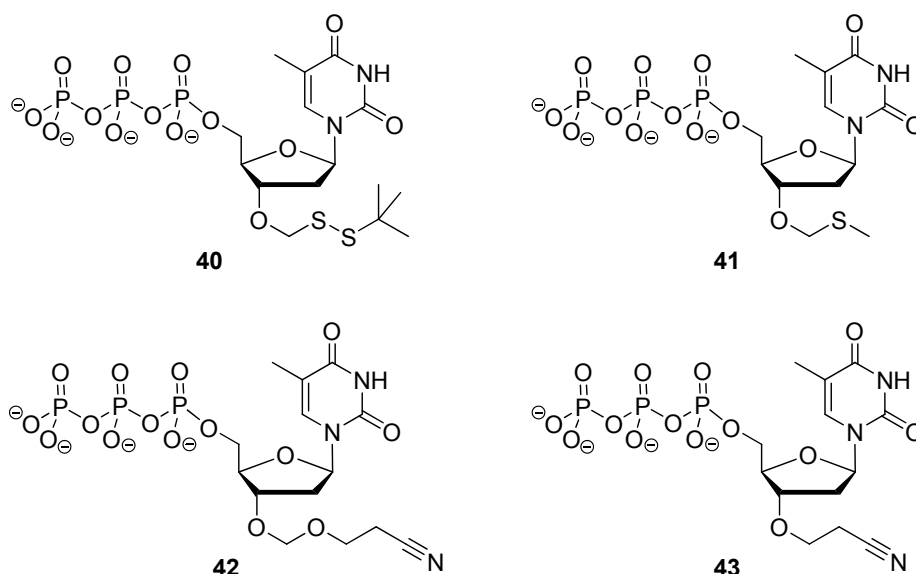
- 1) Die Entwicklung und Synthese von vier kompletten reversiblen Terminatoren. Das heißt die Entwicklung und Synthese von vier 2'-Desoxynukleotiden (dNTPs, N = T, A, C, G), die in reversibler Weise am 3'-Ende blockiert und an der Base über einen spaltbaren Linker mit einem spezifischen Fluoreszenzfarbstoff markiert sind.
- 2) Die Identifizierung, Isolierung und Optimierung einer DNA-Polymerase, welche die vier Farbstoff-markierten, reversiblen Terminatoren akzeptiert.
- 3) Die Entwicklung eines Prototyps für ein mikrofluides System, das zur Durchführung von *Sequenzierung durch Synthese*-Reaktionen geeignet ist.
- 4) Entwicklung eines Software Prototyps für das Primer Design und die Datenanalyse.
- 5) Die Validierung des Konzepts durch eine Resequenzierung. Am Ende des Projekts sollte mit der entwickelten *Sequenzierung durch Synthese*-Technologie ein Nachweis der Durchführbarkeit an 100 immobilisierten Primern, im besten Fall aus dem p53 Genom, erbracht werden.

Das Design und die Synthese der reversiblen Terminatoren sowie die Identifikation und die Optimierung der DNA-Polymerase sind die wichtigsten Voraussetzungen für ein erfolgreiches *Sequenzierung durch Synthese*-Experiment. Gleichzeitig stellen diese

beiden Ziele aber auch die größten Herausforderungen dar, da sehr hohe Anforderungen an die Eigenschaften und die Kompatibilität dieser beiden Komponenten gestellt werden (vergleiche Kapitel 3.4.4). Die Qualität und Effektivität eines *Sequenzierung durch Synthese*-Konzepts wird hauptsächlich durch die Genauigkeit, Selektivität und katalytische Aktivität der Polymerase und der Akzeptanz, Stabilität bzw. Labilität der 3'-blockierenden Gruppe und des Linker/Farbstoffsystems bestimmt.

### 3.5.1 Bisherige Ergebnisse des Projekts

Die Entwicklung des *Sequenzierung durch Synthese*-Konzepts im Rahmen des EU-Projekts begann mit einem Screening verschiedener 3'-Modifikationen in Kombination mit unterschiedlichen Polymerasen hinsichtlich der Akzeptanz der 3'-Modifikation und ihrer Spaltbarkeit. Es wurden dafür unmarkierte, 3'-blockierte Triphosphate verwendet. Die Strukturen der eingesetzten 3'-Modifikationen sind in Abbildung 3-31 gezeigt.



**Abbildung 3-31:** In den Screenings eingesetzte 3'-modifizierte, unmarkierte Triphosphate **40**, **41**, **42** und **43**.

Dabei war neben dem sterischen Anspruch der Modifikation auch die Patentierbarkeit ein wichtiges Kriterium. Die Methylthio-*tert*-butylgruppe (DTM) in Triphosphat **51** war eine der ersten Gruppen, die zur reversiblen Terminierung der Polymerasereaktion eingesetzt wurden. Die DTM-Gruppe wurde bereits 1996 von *Kwiatkowski et al.* (*Quiatech AB*) publiziert und patentiert.<sup>[291-294]</sup> Außer der DTM-Gruppe wurden die Methylthiomethyl- (MTM, **41**), die (2-Cyanoethoxy)methyl- (CEM, **42**) und die 2-Cyanoethylgruppe (CE, **43**) eingesetzt. Bei den untersuchten Polymerasen handelte es



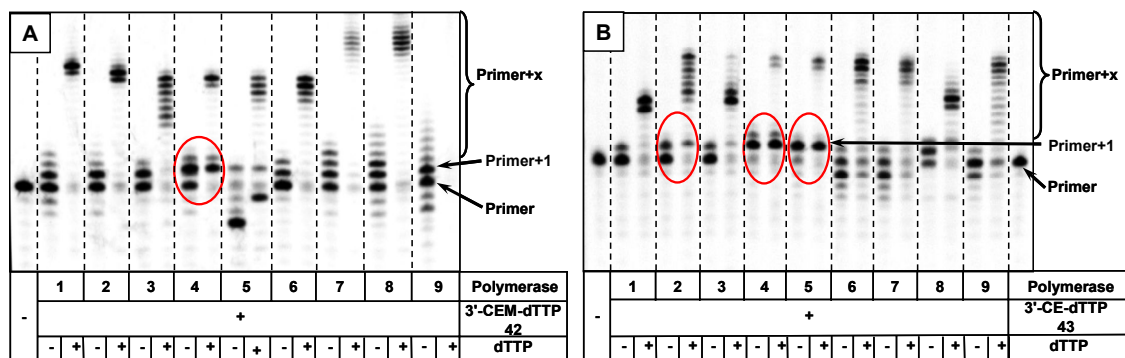
sich um Vertreter aus allen Enzymfamilien (A, B, X, Y, reverse Transkriptase). Dabei wurden sowohl kommerziell erhältliche Enzyme, als auch durch *Fermentas* patentierte DNA-Polymerasen untersucht. Der folgende, am 5'-Ende des Primers <sup>33</sup>P-markierte (\*) DNA-Doppelstrang wurde für die Screenings verwendet:

5' - \*TGCAGGCATGCAAGCTT GGC GTA - 3' 23 nt

3' - ACGTCCGTACGT TCGAACCGCATAAAAAAAAAAAAAA - 5' 35 nt

Es wurde ein mindestens 10facher Überschuss des Enzyms in Vergleich zum Substrat eingesetzt. In manchen Fällen wurde 2'-Desoxythymidin-5'-monophosphat (dTMP) zugegeben, um die exonukleolytische Aktivität der DNA-Polymerase zu inhibieren. Die 3'-modifizierten Triphosphate **40**, **41**, **42** und **43** wurden vor dem Einsatz in der Polymerasereaktion durch das so genannte „mop-up“-Verfahren von Resten an 3'-unmodifizierten Derivaten befreit.<sup>[295]</sup> Die Polymerasereaktion wurde bei 37 °C durchgeführt und nach 5, 15 und 60 Minuten Proben entnommen. Diese Proben wurden dann zum Testen der terminierenden Eigenschaften mit 2'-Desoxythymidin-5'-Triphosphat (50 µM) versetzt und weitere fünf Minuten inkubiert. Die Reaktion wurde dann durch Zugabe des STOP-Puffers (95 % Formamid und 100 mM EDTA) beendet und mittels 15 %igem, denaturierendem (7 M Harnstoff) Polyacrylamidgel (29:1) bei 50 °C aufgetrennt. Das Gel wurde anschließend auf einem Whatman Papier getrocknet und mit einem FUJI Phosphorimager analysiert.

Die Ergebnisse der beiden Schwefel-basierten Gruppen (DTM und MTM) in diesem Test waren nicht überzeugend. Die DTM-Gruppe zeigte sich instabil während der Polymerasereaktion und wies daher keine Terminierung der Kettenverlängerung auf. Im Gegensatz dazu wurde die MTM-Gruppe sehr gut durch unterschiedliche DNA-Polymerasen eingebaut und zeigte eine effiziente Terminierung. Es war jedoch nicht möglich Entschützungsbedingungen zu finden, unter denen die DNA stabil war. Daher konzentrierten sich die weiteren Untersuchungen auf die CEM- und die CE-Gruppe. Beide Gruppen wurden effektiv eingebaut und zeigten sehr gute Terminierungseigenschaften. Die Akzeptanz der CE-Gruppe war dabei aber etwas besser, als die der CEM-Gruppe. In Abbildung 3-32 sind die Gelanalysen der Verlängerungs- und Terminierungsexperimente mit den beiden Triphosphaten **42** und **43** und neun verschiedenen DNA-Polymerasen nach 60 Minuten Reaktionszeit gezeigt.



**Abbildung 3-32:** Gelanalysen der Verlängerungs- und Terminierungsexperimente mit den beiden Triphosphaten **42** und **43** und neun verschiedenen DNA-Polymerasen nach 60 Minuten Reaktionszeit.

Bild **A** zeigt die Verlängerungs- und Terminierungsreaktionen mit dem 3'-O-CEM-modifizierten Nukleotid **42**. Dieses wird zwar von einer ganzen Reihe DNA-Polymerasen gut eingebaut, jedoch führt die Zugabe des natürlichen Triphosphats (dTTP) bis auf eine Ausnahme zu einer mehrfachen Verlängerung des Primers. Nur mit DNA-Polymerase 4 (roter Kreis in Abbildung 3-32 **A**) war sowohl eine relativ saubere +1 Verlängerung, als auch eine Terminierung zu beobachten. Bei allen Polymerasen, so auch bei Polymerase 4, war eine +2 Verlängerung als schwache Bande über dem +1 verlängerten Primer zu sehen. Ein Mechanismus der dazu führt könnte die direkte Abspaltung der 3'-Modifikation durch die Polymerase, die so genannte Editierung, sein.<sup>[233]</sup> Ein weiterer Mechanismus zur Wiederherstellung des ursprünglichen Primers, der für weitere Verlängerungen zugänglich ist, wäre die Abspaltung des 3'-Nukleotids durch Pyrophosphorolyse.<sup>[296]</sup>

In Bild **B** in Abbildung 3-32 ist die Gelanalyse der Verlängerungs- und Terminierungsreaktionen mit dem 3'-O-CE-modifizierte Nukleotid **43** gezeigt. Dieses wurde von den DNA-Polymerasen 2, 4 und 5 gut akzeptiert. In allen drei Fällen war nach Zugabe von dTTP auch eine Terminierung zu beobachten. Beim Vergleich dieser drei Polymerasen wies Polymerase 2 die geringste Effizienz auf, sowohl bei der Primerverlängerung, als auch bei der Terminierung. Bei Polymerase 4 war, im Gegensatz zu Polymerase 5, bereits vor der Zugabe von dTTP deutlich die +2 Verlängerung des Primers zu sehen. Polymerase 5 wies die höchste Einbaueffizienz auf und der +1 verlängerte Primer blieb auch nach Zugabe des natürlichen Triphosphats stabil. Insgesamt ist die vielversprechendste Kombination die CE-Gruppe mit

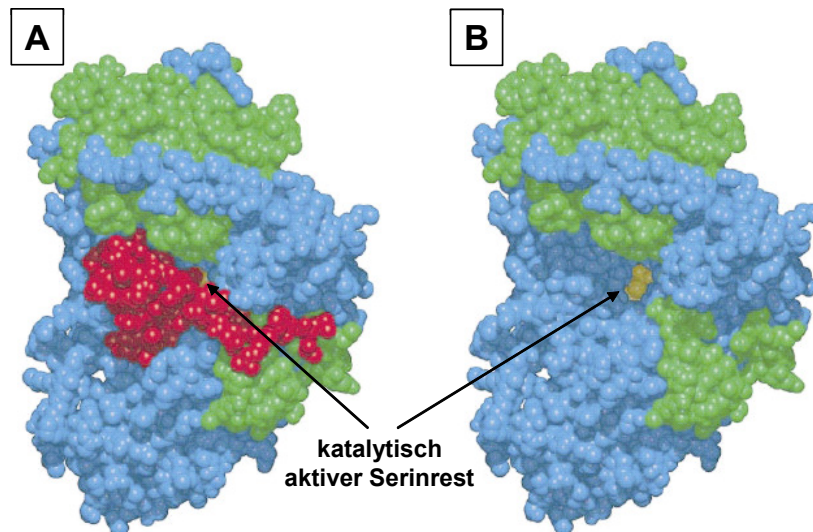
Polymerase 5. Als 3'-blockierende Gruppe für die Entwicklung der reversiblen Terminatoren wurde also die CE-Gruppe gewählt.

Durch die Verwendung dieser Gruppe als 2'-Schutzgruppe in der RNA-Synthese ist bekannt, dass sie mit Fluoridionen unter wasserfreien Bedingungen spaltbar ist.<sup>[297]</sup> Die CE-Gruppe wurde aber bis dahin weder als Schutzgruppe für die 3'-Hydroxygruppe in DNA, noch für den Einsatz in reversiblen Terminatoren verwendet. Mit der Entwicklung von Synthesestrategien zur Einführung der CE-Gruppe an der 3'-Position aller vier Nukleoside und der Optimierung ihrer Spaltungsbedingungen beschäftigte sich *Dr. Angelika Keller* im Rahmen ihrer Dissertation.<sup>[298]</sup> Ein reversibler Terminator benötigt neben der 3'-blockierenden Gruppe auch eine Fluoreszenzmarkierung. Da diese aufgrund des hohen sterischen Anspruchs nicht an der 3'-Position erfolgen kann, ist ein Linke/Farbstoff-System an der Baseneinheit notwendig. Um eine effiziente Entfernung beider Modifikationen nach dem Einbau und der Identifizierung zu gewährleisten, muss die Abspaltung des Linkers synchron mit der Abspaltung der 3'-Modifikation erfolgen. Es war daher notwendig einen Fluorid-spaltbaren Linker zu entwickeln. Die Entwicklung, Synthese und Evaluierung dieses Linkers war Gegenstand dieser Arbeit.

## 3.6 Verwendete Enzyme und Methoden

### 3.6.1 Eigenschaften der Penicillin G Acylase

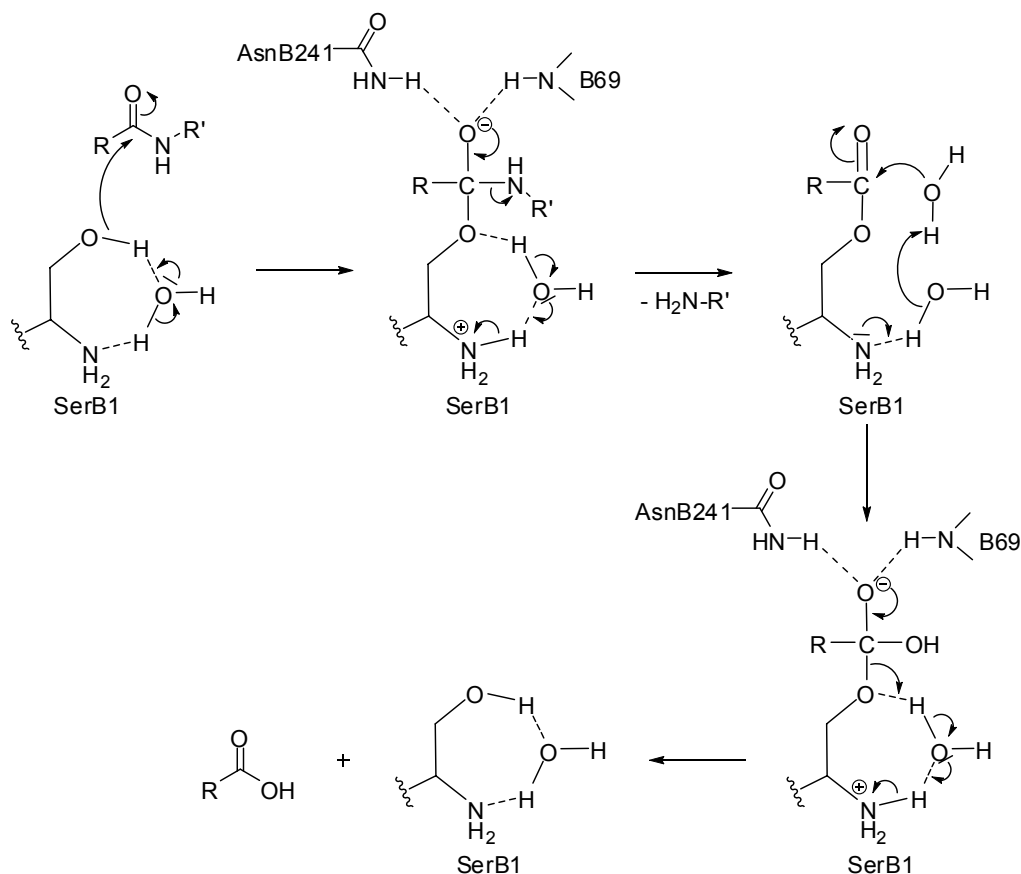
Penicillin G Acylase (PGA) aus *Escherichia coli* (EC 3.5.1.11, 86 kDa, 766 Aminosäuren (AS)) ist ein seit langem bekanntes und sehr gut untersuchtes Enzym.<sup>[299-301]</sup> PGA ist eine Hydrolase, die lineare Amidbindungen in Penicillin Molekülen spaltet. Das Enzym wird zunächst als Vorläufer, bestehend aus einer einzigen Polypeptidkette, in der Zelle gebildet und ist in dieser Form nicht katalytisch aktiv. Der Vorläufer enthält am Anfang des Enzyms eine 26 AS lange Signalsequenz, die den Export in das Zytoplasma steuert und innerhalb des Enzyms eine 54 AS lange Spacereinheit, die die Faltung beeinflusst. Die Signalsequenz und der Spacer werden während des autoproteolytischen Reifungsprozesses entfernt und es entsteht das aus zwei Ketten bestehende, aktive Protein. Diese Ketten werden als A-Kette mit den Aminosäuren A1 bis A209 und B-Kette mit den Aminosäuren B1 bis B557 bezeichnet.<sup>[302-304]</sup> In Abbildung 3-33 sind das Vorläuferenzym und das gereifte Enzym gezeigt.<sup>[304]</sup>



**Abbildung 3-33:** Raumfüllendes Modell des Vorläufers (A) und des gereiften PGA Moleküls (B). Die A Domäne ist in grün, die B Domäne in blau und das Spacerpeptid in rot dargestellt. In gelb ist der katalytisch aktive Serinrest zu sehen (Quelle: Hewitt et al., 2000).<sup>[304]</sup>

Dieses Bild zeigt, dass das in gelb gezeigte, aktive Zentrum im Vorläuferprotein durch die Spacereinheit (rot) blockiert ist.

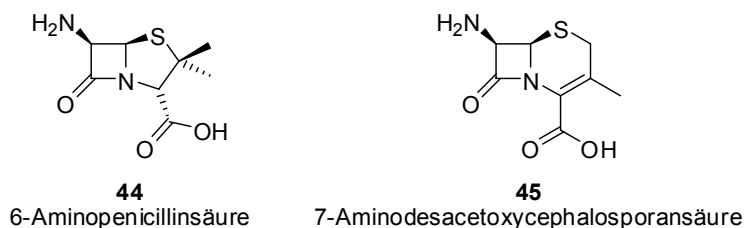
Die Penicillin G Acylase gehört der Familie der Ntn(N-terminal nucleophile)-Hydrolasen an. In dieser Superfamilie besteht das katalytische Zentrum immer aus einer der folgenden, N-terminalen Aminosäure: Serin, Threonin oder Cystein. Im Fall der PGA besteht das katalytische Zentrum aus einem Serinrest. Es handelt sich dabei um den Serinrest am N-Terminus der B-Kette (B1). In Schema 3-2 ist der Mechanismus der Amidhydrolyse durch PGA gezeigt.



**Schema 3-2:** Mechanismus der Amidhydrolyse durch PGA.<sup>[305]</sup>

Bei diesem katalytischen Zentrum handelt es sich nicht um eine Diade oder Triade, bei der weitere Aminosäuren wie beispielsweise Histidin als Base beteiligt sind, sondern um eine einzige Aminosäure. Die Basenfunktion übernimmt hier die  $\alpha$ -Aminogruppe des Serinrests, die über ein Wassermolekül mit der  $\gamma$ -Hydroxgruppe verbrückt ist. Zur Stabilisierung der tetraedrischen Intermediate finden allerdings Wechselwirkungen zu der  $\delta$ -Amidgruppe des Asparaginrest B241 und zu dem Hauptkettenamid B69 statt.<sup>[305]</sup> In der industriellen Anwendung ist Penicillin G Acylase von entscheidender Bedeutung für die Synthese von  $\beta$ -Lactam-Antibiotika.<sup>[306,307]</sup> Seit den sechziger Jahren wird die traditionelle chemische Synthese von  $\beta$ -Lactam-Antibiotika durch enzymatische

Syntheseschritte mit PGA aus *E. coli* erweitert. Dabei werden Penicillin-basierende Antibiotika (semisynthetische Penicilline), wie beispielsweise Amoxicillin und Ampicillin sowie Cephalosporin-basierende Antibiotika (semisynthetische Cephalosporine), wie Cefadroxil oder Cephalexin unterschieden. Erstere werden aus 6-Aminopenicillinsäure **44** und letztere aus 7-Aminodesacetoxycephalosporansäure **45** hergestellt (Abbildung 3-34).



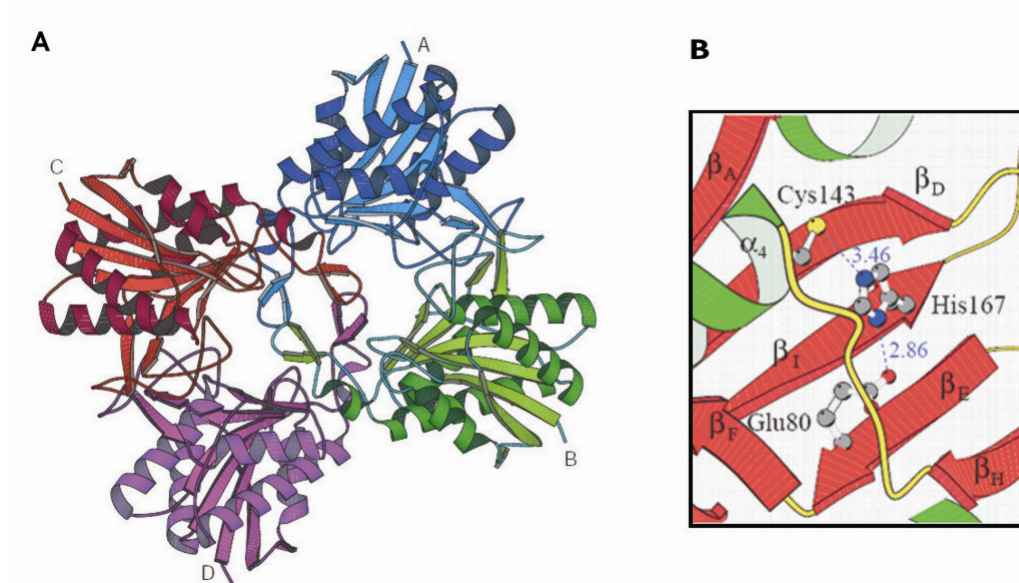
**Abbildung 3-34:** Strukturen von 6-Aminopenicillinsäure **44** und 7-Aminodesacetoxycephalosporansäure **45**.

Der Einsatz von PGA für die organische Festphasensynthese<sup>[97,107-109]</sup> wurde bereits in Kapitel 3.1.2 näher vorgestellt, sie wird außerdem auch für Acylierungen<sup>[308-310]</sup> und in enzymatischen Schutzgruppenstrategien<sup>[311-313]</sup> eingesetzt. Daher sind auch Untersuchungen zu verschiedenen organischen Lösungsmitteln und ihren Auswirkungen auf die Enzymaktivität durchgeführt worden.<sup>[311]</sup>

Penicillin G Acylase ist fast ausschließlich in immobilisierter Form erhältlich. Ein Standardpolymer ist *Eupergit C*<sup>®</sup> (Röhm, Darmstadt), ein Copolymer aus Methacrylamid, *N,N'*-Methylen-bis(acrylamid) und einem Epoxid-funktionalisierten Monomer wie Glycidylmethacrylat oder Allylglycidylether.

### 3.6.2 Eigenschaften der Pyroglutamyl Aminopeptidase I

Die Pyroglutamyl Aminopeptidase I (PAP-I, E.C. 3.4.19.3) ist eine Omega Peptidase, die den Pyroglutamyl Rest vom N-Terminus einer Reihe von Substrat Peptiden hydrolytisch abspaltet. Es wurde erstmals 1968 aus *Pseudomonas fluorescens* isoliert.<sup>[314]</sup> Wenig später wurde das Enzym ebenfalls aus *Bacillus subtilis* isoliert und im Gewebe von Säugetieren, Pflanzen, Vögeln und Fischen nachgewiesen.<sup>[315]</sup> In Säugetieren ist das Enzym hauptsächlich in der Leber, der Niere und im Gehirn angereichert. Die humane PAP-I hat ein Molgewicht von ca. 22 kDa, während das hier verwendete Enzym aus *Pyrococcus furiosus* ein Gewicht von 23 kDa (208 AS) aufweist.<sup>[316]</sup> Es sind drei Formen dieses Enzyms bekannt. Typ I ist eine cytosolische Cysteinpeptidase, Typ II ein membrangebundenes Metalloenzym, die dritte Form ähnelt dem Typ II.<sup>[317]</sup> Da es sich bei der PAP-I um eine Cysteinpeptidase handelt, ist die Anwesenheit eines Thiol-reduzierenden Reagenzes wie Dithiothreitol (DTT) für den Erhalt der Aktivität zwingend erforderlich. Auf der anderen Seite erklärt dies auch die starke Inhibierung des Enzyms durch Sulfhydryl-blockierende Reagenzien wie 4-Chlormercuribenzoessäure (PCMB) oder 2-Iodacetamid.<sup>[317]</sup> Die Aufklärung der dreidimensionalen Struktur der beiden Enzyme aus *Bacillus amyloliquefaciens* und *Thermococcus litoralis* zeigt, dass das Enzym als Homotetramer vorliegt und kaum strukturelle Homologien zu anderen Cysteinpeptidasen aufweist.<sup>[318,319]</sup> Aus Kristallstrukturen des Enzyms und der Studie von Mutanten zeigte sich, dass für die katalytische Aktivität eine Aminosäuretriade aus Cystein, Histidin und Glutaminsäure verantwortlich ist.<sup>[318-320]</sup> In Abbildung 3-35 ist die tetramere Struktur der PAP-I aus *Thermococcus litoralis* (A) und die katalytisch aktive Triade (B) gezeigt.<sup>[319]</sup>



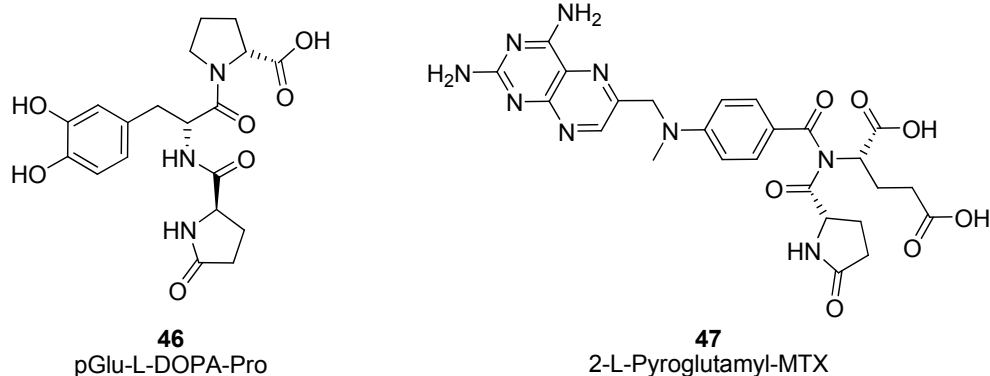
**Abbildung 3-35:** Tetramere Struktur der PAP-I aus *Thermococcus litoralis* (A) und katalytisch aktive Triade aus Cystein, Histidin und Glutaminsäure (B) (Quelle: Singleton et al., 1999).<sup>[319]</sup>

Der Glutaminsäurerest bildet zwei Wasserstoffbrücken zum Pyrrolidonring des Pyroglutamylrests aus, dessen Orientierung durch Wechselwirkungen mit drei weiteren Phenylalaninresten stabilisiert wird. Der Histidinrest dient als Protonenakzeptor bzw. -donor während des nukleophilen Angriffs durch die Cystein Seitenkette.

Die wichtigste Anwendung für die PAP-I steht in Verbindung mit der Peptidsequenzierung nach Edman.<sup>[321]</sup> Da viele Proteine, vor allem Immunglobuline, an ihrem N-Terminus durch Pyroglutamylreste geschützt sind, sind sie für den Edman-Abbau nicht zugänglich und müssen erst durch PAP-I entschützt werden.<sup>[316,322-325]</sup>

Physiologisch relevante Substrate für PAP-I sind beispielsweise die Peptidhormone Thyreoliberin (auch Thyreotropin Releasing Hormon (TRH) genannt), Gonadoliberin (auch luteinisierendes Hormon Releasing-Hormon (LH-RH) genannt) oder Neurotensin.<sup>[317]</sup> Daneben gibt es aber auch eine Reihe synthetischer Substrate, die durch die PAP-I umgesetzt werden. Das macht sie zu einem interessanten Enzym für Prodrugansätze. In Abbildung 3-36 sind zwei Beispiele gezeigt, die als PAP-I-aktivierbare Prodrugs untersucht wurden.





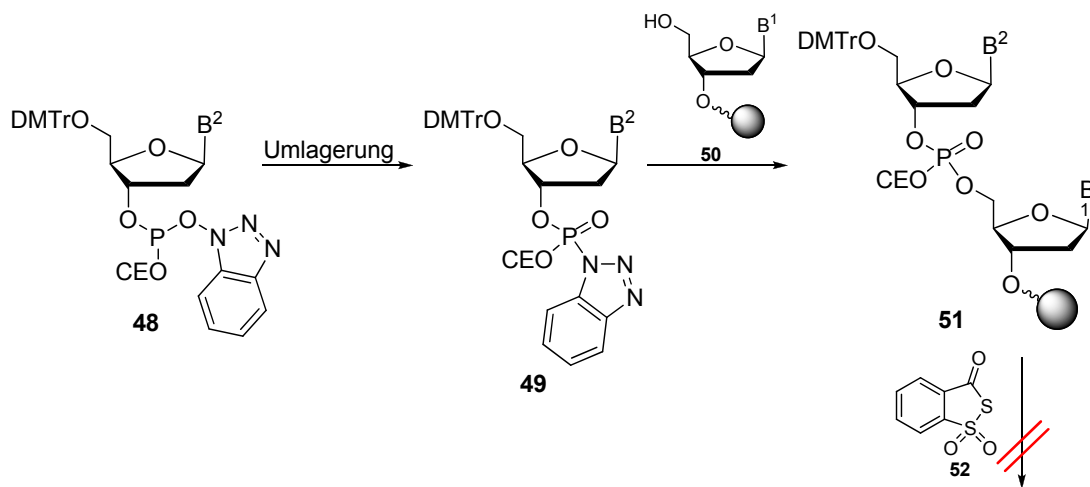
**Abbildung 3-36:** PAP-I-aktivierbare Prodrugs **46** und **47**.

Das tripeptidische Prodrug **46** für L-DOPA (L-3,4-Dihydroxyphenylalanin), einem Therapeutikum zu Behandlung der Parkinson'schen Krankheit, soll eine verbesserte Aufnahme durch aktiven Transport des Prodrugs **46** mittels des intestinalen Peptidtransporters erreichen. Durch anschließende Abspaltung des Pyroglutamylrests durch PAP-I und des Prolylrests durch Prolidase soll dann in zwei Schritten L-DOPA freigesetzt werden. Es konnte gezeigt werden, dass das Tripeptid **46** aktiv durch die Membran des Darms transportiert wird und nach Aufnahme in des Kreislauf durch die beiden Enzyme zu L-DOPA umgesetzt wird.<sup>[326]</sup>

Das zweite Beispiel **47** ist ein Prodrug des Zytostatikums Methotrexat (MTX). Durch die Acylierung der 2-Aminogruppe soll die Toxizität verringert werden. Neben dem L-Pyroglutamylderivat **47** wurden eine Reihe weiterer  $\alpha$ -Aminosäuren untersucht, darunter L-Leucin, L-Valin und L-Isoleucin. Es zeigte sich, dass nur das L-Pyroglutamyl-modifizierte Medikament die erwünschte Stabilität gegen Serumenzyme besaß und dann effektiv durch das erwartete Enzym (PAP-I) zum aktiven Wirkstoff umgesetzt wurde.<sup>[327]</sup>

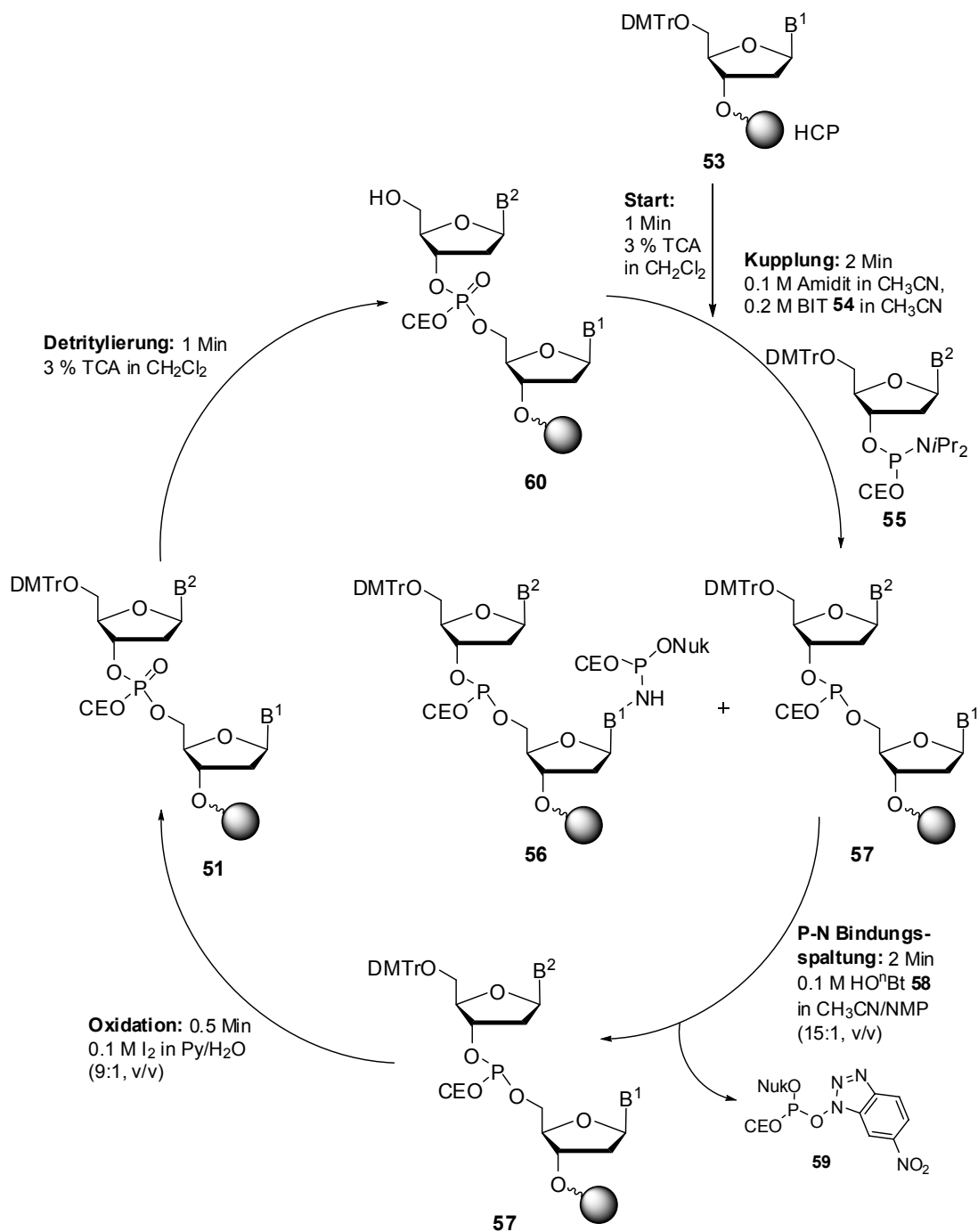
### 3.6.3 Schutzgruppenfreie Methode zur Synthese von Oligonukleotiden nach Sekine et al.

In der Arbeitsgruppe von Prof. Mitsuo Sekine wurde in den letzten Jahren intensiv an schutzgruppenfreien Methoden zur Oligonukleotidsynthese gearbeitet. Die entwickelte Methode basiert auf der hohen *O*-Selektivität von Phosphit-Intermediaten, die durch einen 1-Hydroxybenzotriazol(HOBt)-basierten Aktivator *in situ* aus Phosphoramiditen hergestellt werden.<sup>[87-89,328]</sup> Schwächen weist diese *O*-selektive Methode allerdings bei der Herstellung von Phosphorthioaten auf (Schema 3-3).



**Schema 3-3:** Umlagerung der tervalenten Phosphitspezies **48** zum pentavalenten Phosphoramidat **49**.

Das dreiwertige Phosphit-Intermediat **48** kann zu einem fünfwertigen Phosphoramidat **49** umlagern, dass dann durch Reaktion mit der 5'-Hydroxygruppe des Nukleosids **50** direkt das Phosphat **51** bildet. Dadurch kann keine Sulfurierung mehr stattfinden. Der Anteil der Umlagerung bei der Verwendung von HOBt beträgt ca. 5 %. Bei Einsatz des azideren Derivats 1-Hydroxy-6-triflyl-benzotriazol (HO<sup>Tf</sup>Bt) erhöht sich der Anteil auf 10 %, da die Umlagerung hier schneller stattfindet.<sup>[87]</sup> Von Dr. Ohkubo, einem Mitarbeiter von Prof. Sekine am Tokyo Institute of Technology, wurde eine Variante der Methode für die schutzgruppenfreie Synthese von Ribooligonukleotiden entwickelt.<sup>[329]</sup> In Schema 3-4 ist der Festphasensynthesesyklus der Methode gezeigt.

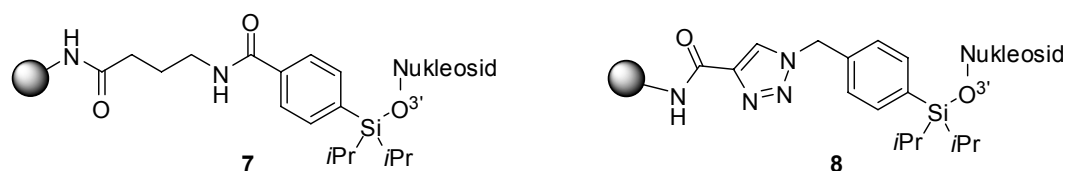


**Schema 3-4:** Festphasensynthesezyklus nach *Ohkubo et al.*<sup>[329]</sup>

Hier wird das weniger *O*-selektive Benzimidazolium Triflat (BIT) **54** als Aktivator verwendet und dafür ein zusätzlicher Schritt zur P-N-Bindungsspaltung mit 1-Hydroxy-6-nitrobenzotriazol ( $\text{HO}^n\text{Bt}$ ) **58** benötigt. Da hier kein Phosphit-Intermediat auftritt, ist die in Schema 3-3 gezeigte Umlagerung nicht möglich und die Methode ist daher auch für die Synthese von Phosphorthioaten geeignet. Die einzelnen Schritte des Synthesezyklus für die automatisierte Festphasensynthese nach *Ohkubo et al.* entsprechen

weitestgehend denen der standardisierten Phosphoramiditsynthese nach *Caruthers*. Die Synthese kann daher einfach an konventionellen Synthesizern durchgeführt werden. Der größte Unterschied ist der zusätzliche Schritt zur Entfernung der P-N-Bindungen mit  $\text{HO}^n\text{Bt}$ . Ansonsten wird als Aktivator nicht 2,4-Dicyanoimidazol oder 1*H*-Tetrazol sondern BIT **54** verwendet und als feste Phase hat sich hochverzweigtes Polystyrol (HCP) im Gegensatz zu CPG als geeigneter erwiesen. Die ungeschützten Phosphoramidite können durch Entschützung mit 1 M  $\text{MeNH}_2$  in THF einfach aus den kommerziell erhältlichen Phosphoramiditen hergestellt werden.<sup>[330]</sup>

Für die Synthese basenlabiler Oligonukleotide ist auch ein alternativer Linker notwendig, der keine basischen Bedingungen zur Spaltung erfordert. *Ohkubo et al.* entwickelten für die schutzgruppenfreie Methode zwei Fluorid-spaltbare Silyl-Linker **7** und **8**, die in Abbildung 3-37 nochmals gezeigt sind, in Kapitel 3.1.1 aber bereits vorgestellt wurden.

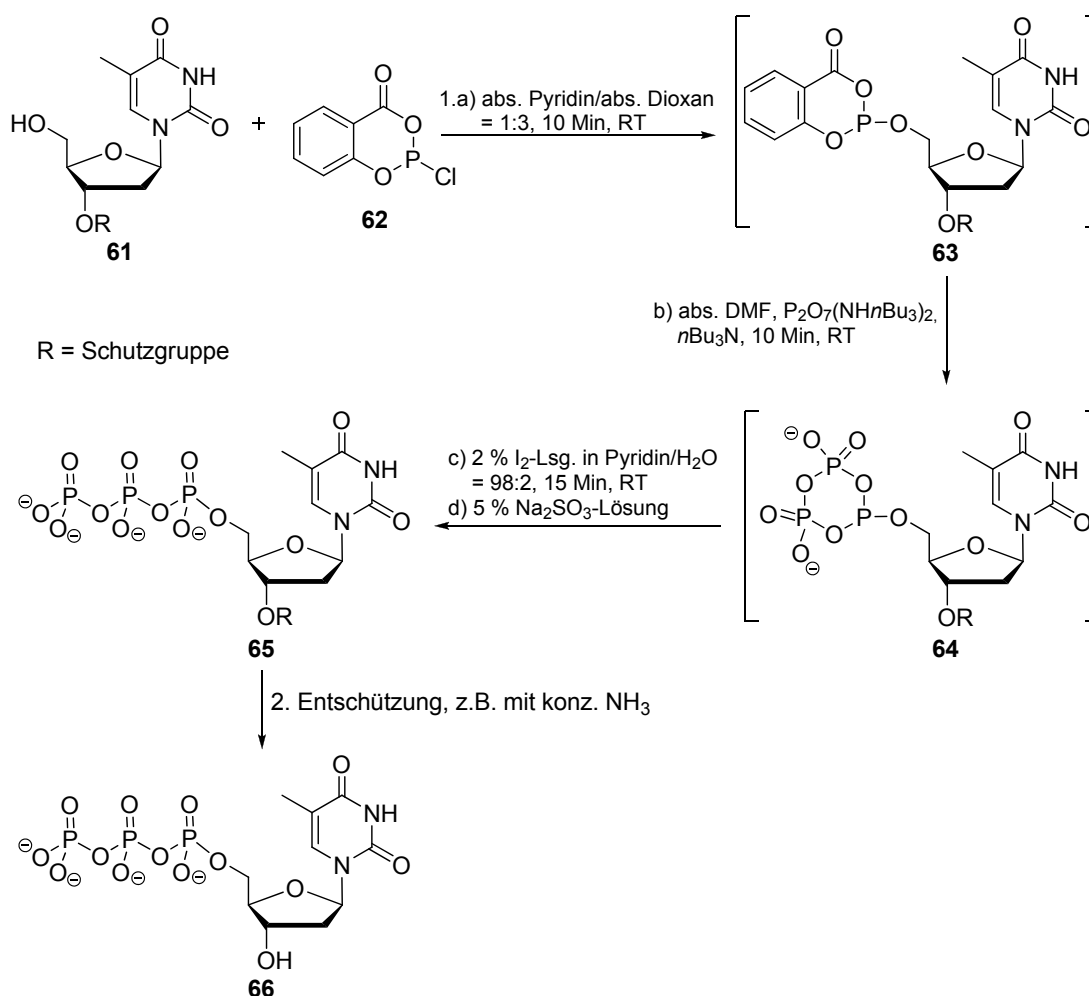


**Abbildung 3-37:** Von *Ohkubo et al.* entwickelte Silyl-Linker **7**<sup>[88]</sup> und **8**<sup>[89]</sup>.

Als Spaltungsreagenzien wurden  $\text{TBAF} \cdot \text{AcOH}$  (1 M in THF) und  $\text{Et}_3\text{N} \cdot 3\text{HF}$  (0.2 M in THF) untersucht. Der amidverknüpfte Linker **7** lässt sich mit beiden Fluorid-Reagenzien leicht spalten,<sup>[88]</sup> der über eine „Click“-Reaktion angebundene Linker **8** ist bevorzugt mit  $\text{TBAF} \cdot \text{AcOH}$  spaltbar.<sup>[89]</sup>

### 3.6.4 Synthese und Eigenschaften von 5'-Triphosphaten

5'-Triphosphate sind vor allem für die DNA-Sequenzierung von großer Bedeutung. Es wurden daher eine Reihe sowohl chemischer, als auch enzymatischer Methoden zu ihrer Herstellung entwickelt.<sup>[331-333]</sup> Eine der bekanntesten und etabliertesten ist die Methode nach *János Ludwig* und *Fritz Eckstein* aus dem Jahr 1989.<sup>[332]</sup> Da diese Methode in dieser Arbeit zur Herstellung der 5'-Triphosphate genutzt wurde, soll sie hier näher vorgestellt werden. Der Verlauf der dreistufigen Eintopfreaktion und die relevanten Zwischenstufen sind in Schema 3-5 am Beispiel eines 3'-O-geschützten 2'-Desoxythymidin Nukleosids **61** gezeigt.



**Schema 3-5:** Triphosphatsynthese nach der Methode von *Ludwig* und *Eckstein*.<sup>[332]</sup>

Die verwendete Methode beruht auf dem Einsatz des dreiwertigen 2-Chlor-4H-1,2,3-benzodioxaphosphorin-4-on **62** als Phosphorylierer. Im ersten Schritt findet dann eine nukleophile Substitution am Phosphor durch die 5'-Hydroxygruppe statt und man erhält

innerhalb von zehn Minuten das Intermediat **63**. Dessen Bildung wird durch das Ausfallen von Pyridinium Hydrochlorid angezeigt. Um die Regioselektivität dabei zu gewährleisten müssen 3'-*O*-geschützte Nukleoside eingesetzt werden. Es ist aber nicht notwendig die Aminogruppen an den Basen zu schützen. Der nächste Schritt ist die Zugabe einer Bis-(tri-*n*butylammonium)pyrophosphat-Lösung und Tri-*n*butylamin. Durch zweimalige nukleophile Substitution wird Salicylsäure abgespalten und das cyclische Triphosphat **64** innerhalb von weiteren zehn Minuten gebildet. Durch Oxidation des  $\alpha$ -Phosphoratoms mit Iod und anschließender Hydrolyse wird dann das lineare 5'-Triphosphat **65** erhalten. Durch die 5 %ige Natriumsulfit-Lösung werden außerdem Reste an elementarem Iod deaktiviert. Im Anschluss kann die Entfernung der 3'-Hydroxyschutzgruppe direkt vom Rohprodukt erfolgen. Da es sich meist um Estergruppen wie beispielsweise Acetyl handelt, wird mit konzentriertem Ammoniak entschützt. Die Aufreinigung von nukleosidischen Triphosphaten erfolgt in der Regel über mehrere chromatographische Trennschritte. Zunächst wird über eine Anionenaustausch-FPLC ein Großteil des Pyrophosphats, die unpolaren Reagenzien und Nebenprodukte wie Monophosphat und anorganische Polyphosphate abgetrennt. Als Trennmateriale dient hierbei DEAE-Cellulose mit einem Triethylammoniumbicarbonat (TEAB)-Puffer als Eluent. Da Pyrophosphationen die gleiche Ladung tragen wie Triphosphate, ist die Trennung oftmals nicht vollständig und eine zweite chromatographische Reinigung notwendig. Diese erfolgt meist an einem HPLC-System und kann eine zweite Anionenaustausch- oder eine RP-Chromatographie sein. Eine Anionenaustausch-HPLC wird mit einem Kaliumphosphat-Puffer und einem Gradienten an Formamid durchgeführt. Bei der RP-HPLC wird meist ein drei Komponenten System aus Millipore Wasser, Acetonitril und einem Puffer verwendet. Als Puffer eignen sich dabei besonders die leicht flüchtigen, protischen Ammoniumsalz-Puffer Triethylammoniumacetat (TEAA) und TEAB.<sup>[333]</sup>

In Breitband entkoppelten  $^{31}\text{P}$ -NMR Spektren von 5'-Triphosphaten in  $\text{D}_2\text{O}$  sind drei charakteristische Signale zu sehen. Ein Dublett bei ca. -6 ppm ( $\gamma$ -Phosphoratom), ein Dublett bei ca. -11 ppm ( $\alpha$ -Phosphoratom) und ein Triplett bei ca. -22 ppm ( $\beta$ -Phosphoratom). Die Kalibrierung erfolgt üblicherweise mittels eines externen Standards wie  $\text{H}_3\text{PO}_4$ .

Die Synthese nukleosidischer Triphosphate, ihre Aufreinigung, die Charakterisierung und Lagerung sind aus verschiedenen Gründen schwierig. Aufgrund der Anwesenheit geschützter, unpolarer Nukleoside und ionisch vorliegender Reagenzien wie Pyrophosphat ist bei der Synthese die Wahl des Lösungsmittels von entscheidender Bedeutung. 5'-Triphosphate sind hydrolyseempfindlich, vor allem im sauren oder basischen Milieu. Mit den richtigen Gegenionen können sie allerdings unter neutralen Bedingungen oder auch als Feststoffe sehr lange gelagert werden. In besonderer Weise eignen sich dazu Trialkylammonium-Ionen.





# 4 Safety-Catch-Linker für zielgerichtete Zellaufnahme

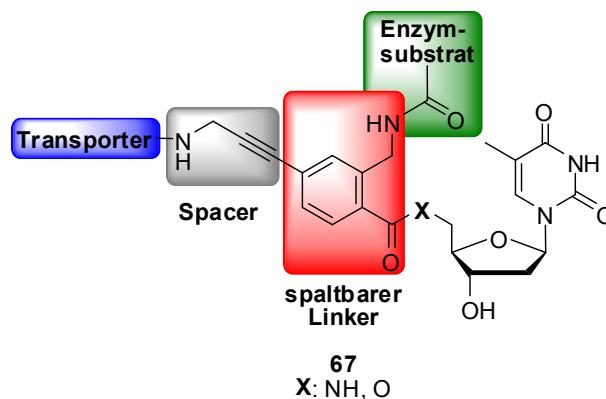
Das erste Ziel dieser Arbeit war die Entwicklung, Synthese und Untersuchung eines enzymatisch spaltbaren Safety-Catch-Linkers, der die reversible Anbindung von Transportermolekülen für eine verbesserte Zellaufnahme von Antisense-Oligonukleotiden ermöglicht. Motivation dieses Ansatzes waren die in Kapitel 3.3.1 beschriebenen Untersuchungen zur zielgerichteten Zellaufnahme von Cholsäure-modifizierten Oligonukleotiden. Die dabei beobachtete Hauptschwierigkeit war eine schnelle Exkretion der modifizierten Oligonukleotide von der Leber in die Galle. Das hatte zur Folge, dass die Verweildauer der therapeutischen Oligonukleotide trotz der verbesserten Aufnahme gering war. Ein möglicher Lösungsansatz für dieses und ähnliche Probleme, die durch die permanente Kupplung an ein Transportermolekül hervorgerufen werden können, ist daher die Verwendung eines spaltbaren Linkers.

Im Folgenden werden nun die Synthese und die Untersuchung der Eigenschaften des entwickelten, enzymatisch spaltbaren Safety-Catch-Linkers vorgestellt. Dabei soll zunächst auf die zugrunde liegende Strategie für das Design des Linkers eingegangen werden.

## 4.1 Design und Synthesestrategie des enzymatisch spaltbaren Safety-Catch-Linkers

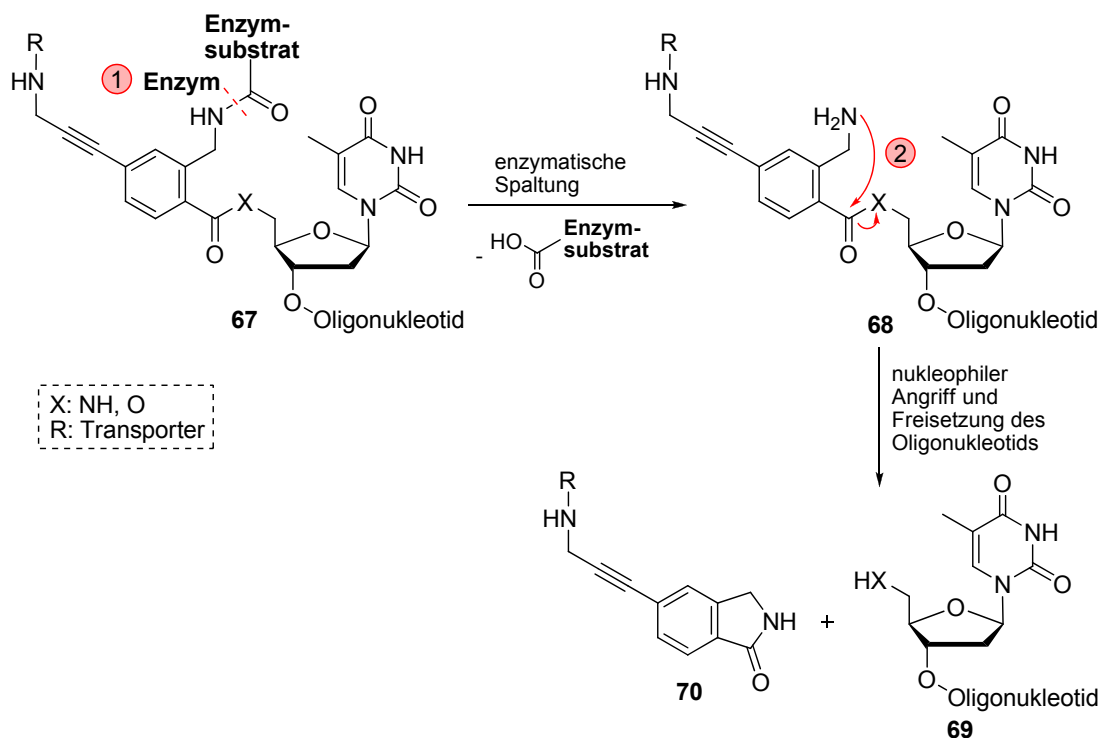
Um einen variablen Safety-Catch-Linker zu entwickeln bietet sich eine *exo*-Linker Strategie an (siehe Kapitel 3.1.2, Seite 15). Sie ermöglicht verschiedene Anbindungsstellen für das Enzymsubstrat und das Zielmolekül, so dass beide leicht variierbar sind. Um dann zusätzlich eine Transportereinheit am Linker zu präsentieren ist eine aromatische Grundeinheit geeignet, da sie verschiedene Anknüpfungspunkte zur Verfügung stellt. Als Spacer (grau in Abbildung 4-1) wurde Propargylamin gewählt, da der Einbau leicht über eine Kreuzkupplung gelingen und die primäre Aminogruppe eine selektive Anbindung des Transportermoleküls ermöglichen sollte. Der Safety-Catch-Linker sollte außerdem an ein Nukleotid angeknüpft werden, um die Modifikation der

Oligonukleotide während der Festphasensynthese zu ermöglichen. Aus diesen Überlegungen ergab sich die in Abbildung 4-1 dargestellte, allgemeine Struktur **67** für den an die 5'-Position eines Nukleotids angebundenen, enzymatisch spaltbaren Safety-Catch-Linker.



**Abbildung 4-1:** Allgemeine Struktur **67** des enzymatisch spaltbaren Safety-Catch-Linkers.

Als Nukleosid wurde 2'-Desoxythymidin gewählt, da hier keine zusätzlichen Schutzgruppen während der Synthese notwendig sind. Die Linkereinheit (rot) kann über ein Amid oder einen Ester ( $X = \text{NH}, \text{O}$ ) an die 5'-Position des Nukleosids angebunden werden. Dadurch stellt das modifizierte Nukleosid dann den letzten Baustein eines Oligonukleotids dar. Die Anbindung des Transporters (blau) an die primäre Aminogruppe des Linker-modifizierten Oligonukleotids soll postsynthetisch an der festen Phase erfolgen. Mit dieser Strategie wurden im Arbeitskreis von *Prof. Engels* gute Ergebnisse bei der Modifikation von siRNAs mit kationischen Gruppen erzielt.<sup>[334,335]</sup> Als Enzymsubstrate (grün) kommen Amide in Frage, die dann durch ihre spezifischen Amidasen gespalten werden sollen. Die enzymatische Hydrolyse des Amids am Enzymsubstrat ist der Auftaktschritt ① des in Schema 4-1 gezeigten, erwarteten Spaltungsmechanismus.

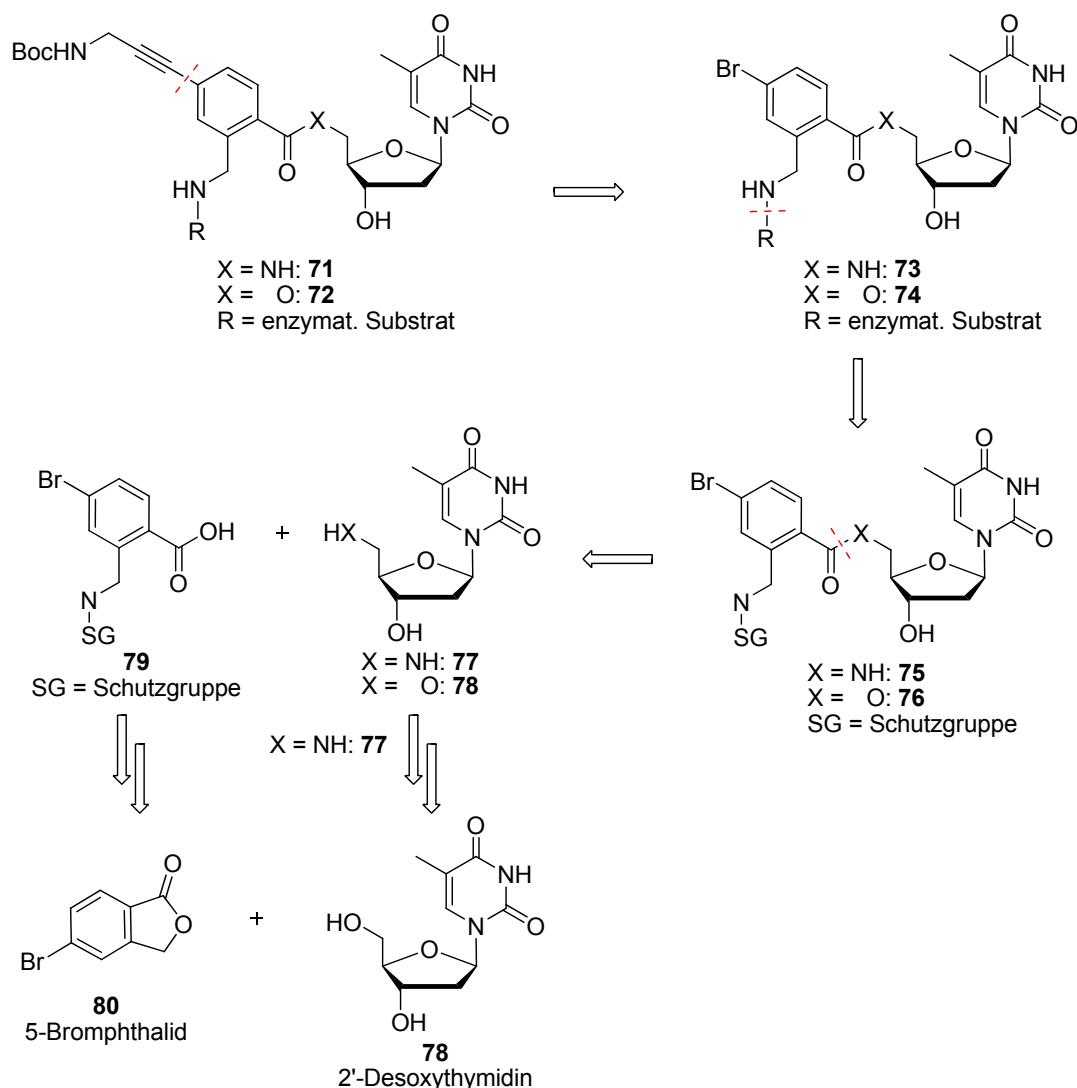


**Schema 4-1:** Erwarteter, zweistufiger Spaltungsmechanismus des Safety-Catch-Linkers **67**.

Schritt ② des Spaltungsmechanismus ist der intramolekulare, nukleophile Angriff des nun freien Amins an der Carbonylgruppe des Amids oder Esters, an dem das Oligonukleotid angebunden ist. Durch den Angriff des Amins entsteht ein Fünfringlactam und das Oligonukleotid fungiert als Abgangsgruppe. Dieses wird dadurch ohne einen Rest des Linkers zu enthalten freigesetzt. Es ist geplant, sowohl den Ester, als auch das Amid zu synthetisieren und die Spaltungseigenschaften, insbesondere die intramolekulare Zyklisierung zu untersuchen. Bei dem Amid könnte dessen Stabilität ein Problem darstellen, da die Zyklisierung bei 37 °C zu langsam ablaufen könnte. Eine deutlich langsamere Zyklisierung des Amids im Gegensatz zum Ester wurde bei einem ähnlichen, in Kapitel 3.1.2 vorgestellten Linker **12** beobachtet.<sup>[107]</sup> Allerdings handelt es sich hier um ein strukturell unterschiedliches System, weshalb die Ergebnisse nicht einfach übertragbar sind. Bei einem Ester könnte die Schwierigkeit in einer nicht ausreichenden Stabilität begründet sein. Er könnte bereits in wässrigem Milieu, ohne die Anwesenheit des Enzyms das Oligonukleotid durch spontane Hydrolyse freisetzen. Das dieses Konzept der intramolekularen Ringbildung generell unter milden Bedingungen funktioniert konnte an dem in Kapitel 3.1.2 vorgestellten Linker **12**<sup>[108]</sup> und durch zwei Schutzgruppen (2-(Azidomethyl)-

benzoyl<sup>[336]</sup> und (2-Azidomethyl)phenylacetyl<sup>[337]</sup> gezeigt werden. Daher wurde das Design des Linkers für potentielle *in vivo* Anwendungen zur Verbesserung der Zellaufnahme von Oligonukleotiden so gewählt.

Im folgenden Schema 4-2 wird die Synthesestrategie des Safety-Catch-Linkers anhand der retrosynthetischen Analyse vorgestellt.



**Schema 4-2:** Retrosynthetische Analyse der Synthesestrategie für den enzymatisch spaltbaren Safety-Catch-Linker.

Um eine möglichst effektive Variation des enzymatischen Substrats zu ermöglichen sollten dieses in einem möglichst späten Schritt der Reaktionssequenz eingeführt werden. Der Spacer (*N*-Boc-Propargylamin) soll über eine Sonogashira Kupplung eingeführt werden. Die Anbindung des Enzymsubstrats soll durch Verwendung des entsprechenden Säurechlorids oder aktivierten Esters in einer Amidsynthese durchgeführt werden. Ein wichtiger Punkt ist die Wahl der Schutzgruppe an der 2-Amino-

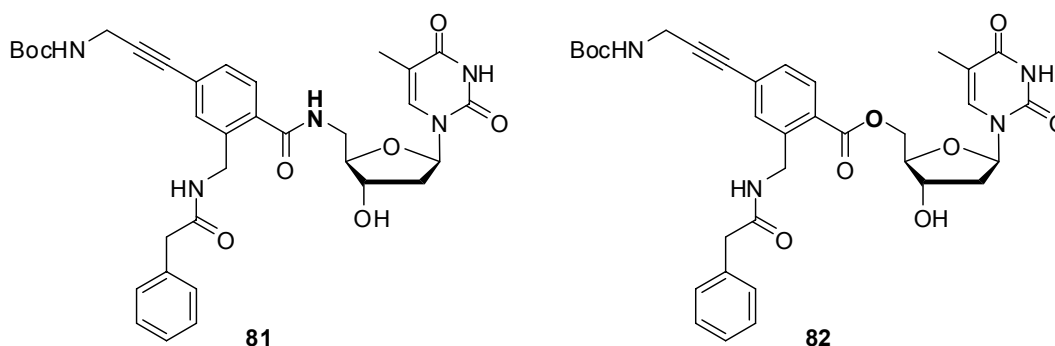
methylgruppe im aromatischen Baustein **79**. Eigene Vorversuche die hier nicht im Detail diskutiert werden haben gezeigt, dass es in Anwesenheit eines Protons an der 2-Aminomethylgruppe zu einer unerwünschten Nebenreaktion kommt. Bei der Aktivierung der Säurefunktion für die Amidkupplung eines ähnlichen Aromaten an 5'-Amino-2'-desoxythymidin **77** wurde eine intramolekulare Zyklisierung, entsprechend dem erwarteten Spaltungsmechanismus (siehe Schema 4-1) beobachtet.

Die beiden Kupplungspartner **79** und **77** bzw. **78** lassen sich dann auf die einfach kommerziell erhältlichen Ausgangssubstanzen 2'-Desoxythymidin **78** und 5-Bromophthalid **80** zurückführen. Die Synthese von 5'-Amino-2'-desoxythymidin **77** ausgehend von 2'-Desoxythymidin **78** ist in der Literatur bekannt und gelingt über die Aktivierung der 5'-Hydroxygruppe durch Tosylierung und anschließender nukleophiler Substitution mit Natriumazid.<sup>[338,339]</sup> Das Azid kann dann durch katalysierte Hydrogenolyse oder Staudinger Reduktion in das Amin überführt werden.<sup>[338,340]</sup> Für die Synthese eines geschützten Bausteins wie **79** aus 5-Bromophthalid **80** sind nur Literaturbeispiele mit der Stammverbindung Phthalid bekannt, bei denen eine geeignete Schutzgruppe direkt durch die Öffnung des Lactons eingeführt werden konnte.<sup>[341,342]</sup> Diese sollen auf das 5-Bromoderivat **80** übertragen werden.

Im folgenden Kapitel werden nun die Synthesen der beiden Penicillin G Acylase spaltbaren Safety-Catch-Linker **81** und **82** entsprechend der vorgestellten Synthesestrategie beschrieben.

## 4.2 Synthese der beiden mit Penicillin G Acylase spaltbaren Safety-Catch-Linker 81 und 82

Als erstes wurde die Phenylacetylgruppe als Enzymsubstrat gewählt. Sie ist durch die Penicillin G Acylase (PGA) spaltbar. PGA ist ein häufig verwendetes, gut untersuchtes und kommerziell erhältliches Enzym (siehe Kapitel 3.6.1). Außerdem ist auch das Substrat direkt als Säurechlorid kommerziell erhältlich. Somit stellt das ein kostengünstiges und einfach zugängliches System dar, um die Synthese zu optimieren und die Spaltung des neuen Linkers zu untersuchen. Die resultierenden Safety-Catch-Linker **81** und **82** sind in Abbildung 4-2 gezeigt.

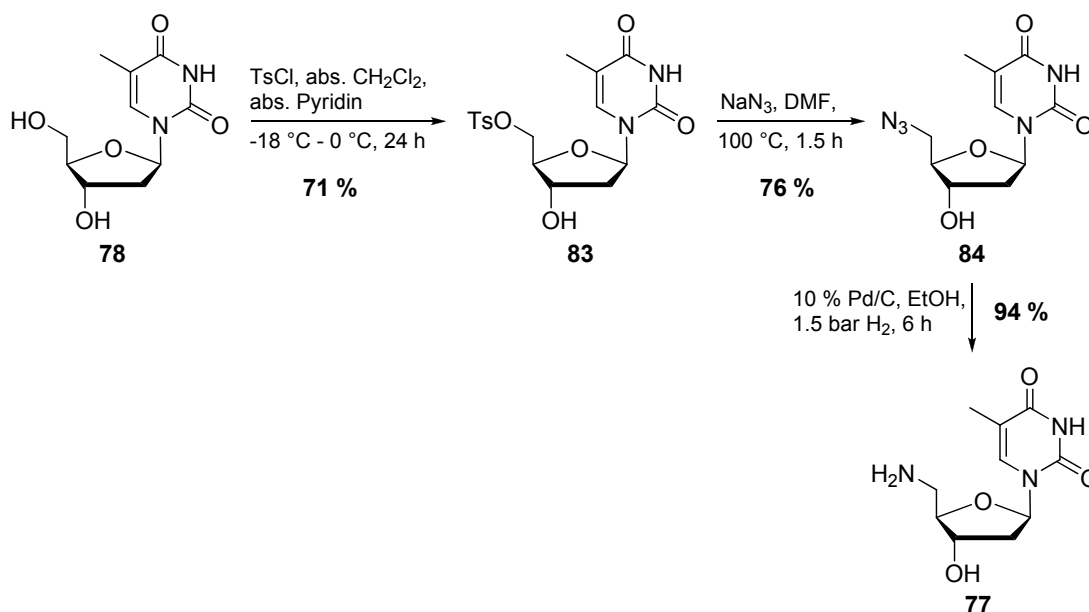


**Abbildung 4-2:** Safety-Catch-Linker **81** und **82** für die Spaltung mit Penicillin G Acylase.

Im folgenden Kapitel soll zunächst die Synthese des Amid-verknüpften Safety-Catch-Linkers **81** beschrieben werden.

### 4.2.1 Synthese des Amid-verknüpften Safety-Catch-Linkers 81

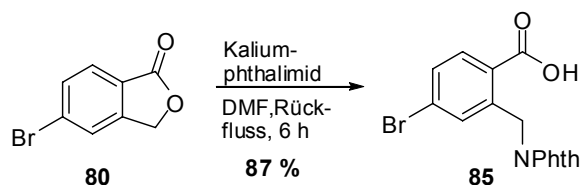
Für die Amidbindung in Verbindung **81** ist der Einsatz des 5'-Amino modifizierten 2'-Desoxythymidin **77** notwendig. Dieses kann aus 2'-Desoxythymidin **78** in drei literaturbekannten Schritten mit guten bis sehr guten Ausbeuten hergestellt werden.<sup>[338,339]</sup> Die Synthese ist in Schema 4-3 gezeigt.



**Schema 4-3:** Synthese von 5'-Amino-2'-desoxythymidin **77**.

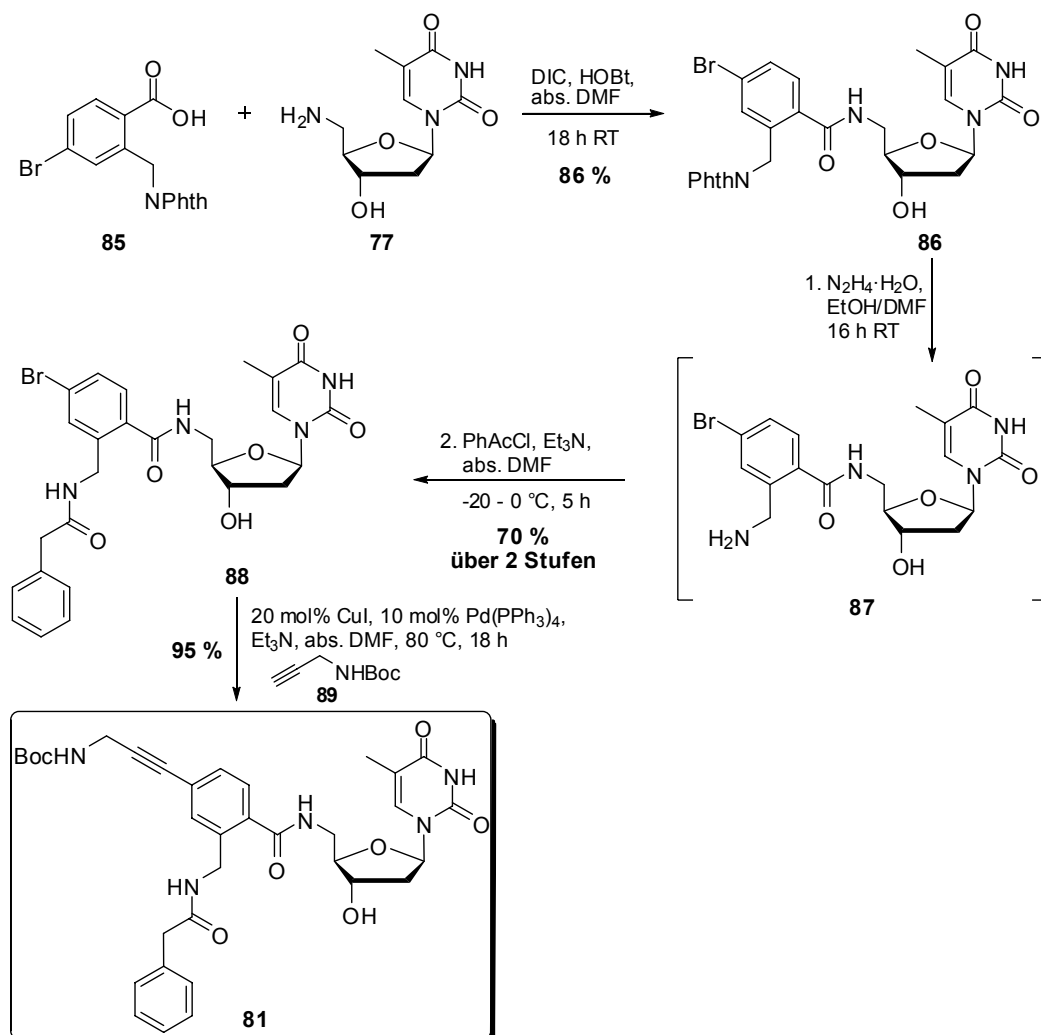
Im ersten Schritt muss die 5'-Hydroxygruppe durch Tosylierung in eine gute Abgangsgruppe überführt werden. Dafür wurde das Nukleosid **78** in trockenem Pyridin bei -18 °C vorgelegt und eine Lösung von Tosylchlorid in trockenem Dichlormethan zugetropft. Die Temperatur sollte 0 °C nicht übersteigen, um eine gute Selektivität für die 5'- im Gegensatz zur 3'-Hydroxygruppe zu erreichen. Das tosylierte Produkt **83** wurde mit einer guten Ausbeute von 71 % (Literatur: 63 %<sup>[339]</sup>) erhalten. Die weitere Umsetzung mit Natriumazid in DMF bei 100 °C liefert in 90 Minuten das substituierte Produkt **84** mit 76 % Ausbeute (Literatur: 75 %<sup>[338]</sup>). Im letzten Schritt muss das Azid noch zum entsprechenden Amin reduziert werden. Dies wurde mit 1.5 bar Wasserstoffdruck und 10 %igem Palladium auf Aktivkohle als Katalysator in Ethanol durchgeführt. Nach einer Filtration über Kieselgel erhält man so das Amin mit einer sehr guten Ausbeute von 94 % (Literatur: 79 %<sup>[338]</sup>).

Als Schutzgruppe für die Aminofunktion am aromatischen Baustein **79** ist die Phthaloylgruppe die erste Wahl, da sie in nur einem Schritt einföhrbar ist. Die Lactonöffnung an 5-Bromophthalid **80** mit Kaliumphthalimid ist in Schema 4-4 gezeigt.



**Schema 4-4:** Ringöffnung von 5-Bromophthalid **80** mit Kaliumphthalimid.

Die Übertragung der Bedingungen für Phthalid auf 5-Bromophthalid **80** verlief ohne Nebenreaktionen. Die Reaktion wurde in einem recht großen Maßstab von 50 g durchgeführt. Zu beachten ist lediglich, dass der Niederschlag des Produkts 16 Stunden altern sollte, da er sonst nur sehr schlecht filtrierbar ist. Die *N*-Phthaloyl geschützte Säure **85** konnte so mit einer sehr guten Ausbeute von 87 % erhalten werden. In Schema 4-5 ist die weitere Synthese zu Verbindung **81** dargestellt.



**Schema 4-5:** Synthese des Amid-verknüpften Safety-Catch-Linkers **81**.

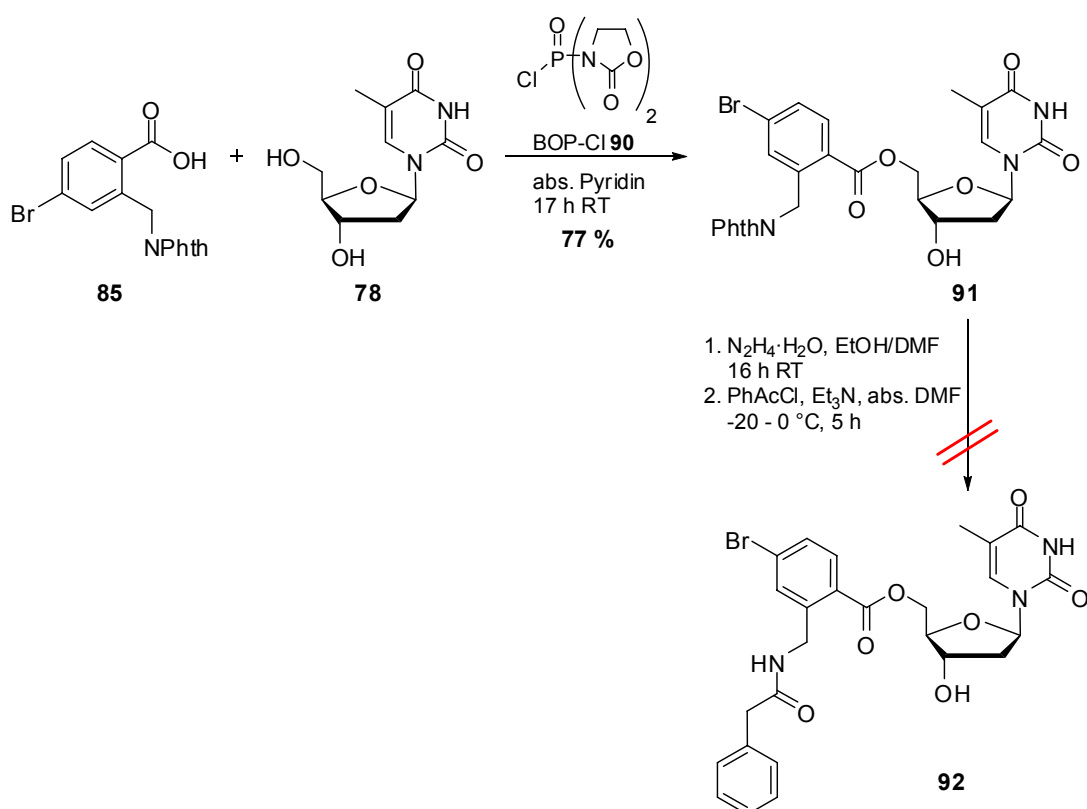


Der Synthesestrategie folgend ist der nächste Schritt nach der Herstellung des 5'-Amino modifizierten Nukleosids **77** und der geschützten Säure **85** die Amidkupplung der beiden Bausteine. Dies konnte erfolgreich mit Diisopropylcarbodiimid (DIC) und 1-Hydroxybenzotriazol (HOBt) als Aktivatoren in trockenem Dimethylformamid (DMF) erreicht werden. Die Ausbeute bei dieser Reaktion lag bei sehr guten 86 %. Die anschließende Entschützung der Aminogruppe und die Anbindung des enzymatischen Substrats wurden direkt hintereinander ohne Aufreinigung des freien Amins **87** durchgeführt. Dazu wurde das 5'-modifizierte Nukleosid **86** unter leichtem Erwärmen in DMF gelöst und dann das doppelte Volumen an Ethanol sowie 3 Äquivalente Hydrazin Monohydrat zugegeben. Die Reaktionsmischung wurde 18 Stunden bei Raumtemperatur gerührt. Da für die Umsetzung mit dem Phenylacetylchlorid (PhAcCl) trockene Bedingungen notwendig waren und die Anwesenheit des überschüssigen Hydrazins zu Nebenreaktionen geführt hätte, musste das entschützte Rohprodukt **87** getrocknet werden. Das Lösungsmittel wurde dazu im Vakuum entfernt und das Rohprodukt **87** noch mehrere Stunden im Vakuum getrocknet bevor die weitere Umsetzung erfolgen konnte. Hierfür wurde das freie Amin **87** in trockenem DMF aufgenommen und bei -20 °C mit Triethylamin und Phenylacetylchlorid versetzt. Die Temperatur wurde dann auf 0 °C erhöht und insgesamt fünf Stunden gerührt. Man erhielt das Phenylacetyl-funktionalisierte Amid **88** mit einer Ausbeute von 70 % über zwei Stufen. Das freie Amid **87** konnte ebenfalls isoliert und charakterisiert werden. Es ist also stabil und neigt nicht zur sofortigen Zyklisierung. Bei der abschließenden Sonogashira Kupplung mit dem Bromid **88** war eine Erhöhung der Temperatur auf 80 °C notwendig. Die Verfolgung dieser Reaktion war nur mittels RP-HPLC effektiv möglich, da Edukt und Produkt in der Dünnschichtchromatographie nicht aufgetrennt werden konnten. Unter den angegebenen, optimierten Bedingungen und durch die RP-HPLC-gestützte Reaktionskontrolle konnte eine sehr gute Ausbeute von 95 % erzielt werden.

Die Synthese des ersten neuen Linkers **81** konnte entsprechend der erarbeiteten Synthesestrategie mit einer sehr guten Gesamtausbeute von 50 % über fünf Stufen durchgeführt werden.

### 4.2.2 Synthese des Ester-verknüpften Safety-Catch-Linkers 82

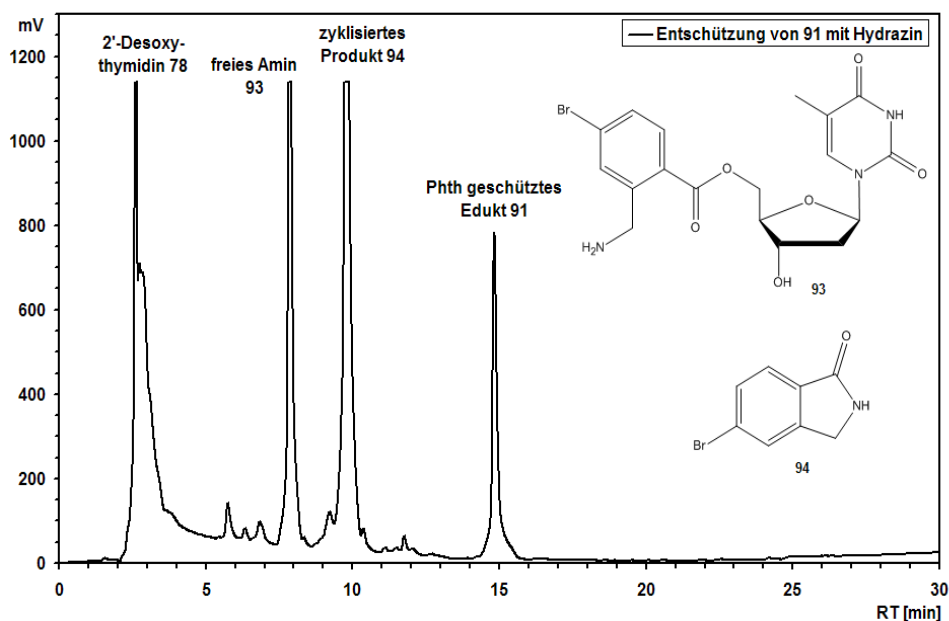
Die Phthalimid Schutzgruppe hat sich für die Herstellung des Amid-verknüpften Zielmoleküls **81** bewährt. Daher wurde diese Schutzgruppenstrategie auch für das zweite Zielmolekül **82** gewählt. Eine Veränderung auf der Stufe der Esterbildung musste allerdings direkt vorgenommen werden. Ester lassen sich mit den für die Amidbildung eingesetzten Aktivierungsreagenzien (DIC, HOBt) schlecht aufbauen. Stattdessen wurde Bis(2-oxo-3-oxazolidinyl)phosphorsäurechlorid (BOP-Cl) **90** als Aktivator eingesetzt.<sup>[343]</sup> In Schema 4-6 ist der Syntheseversuch von Verbindung **82** mittels der Phthalimid Route dargestellt.



**Schema 4-6:** Syntheseversuch des Ester-verknüpften Safety-Catch-Linkers **82** unter Verwendung der Phthalimid Schutzgruppe.

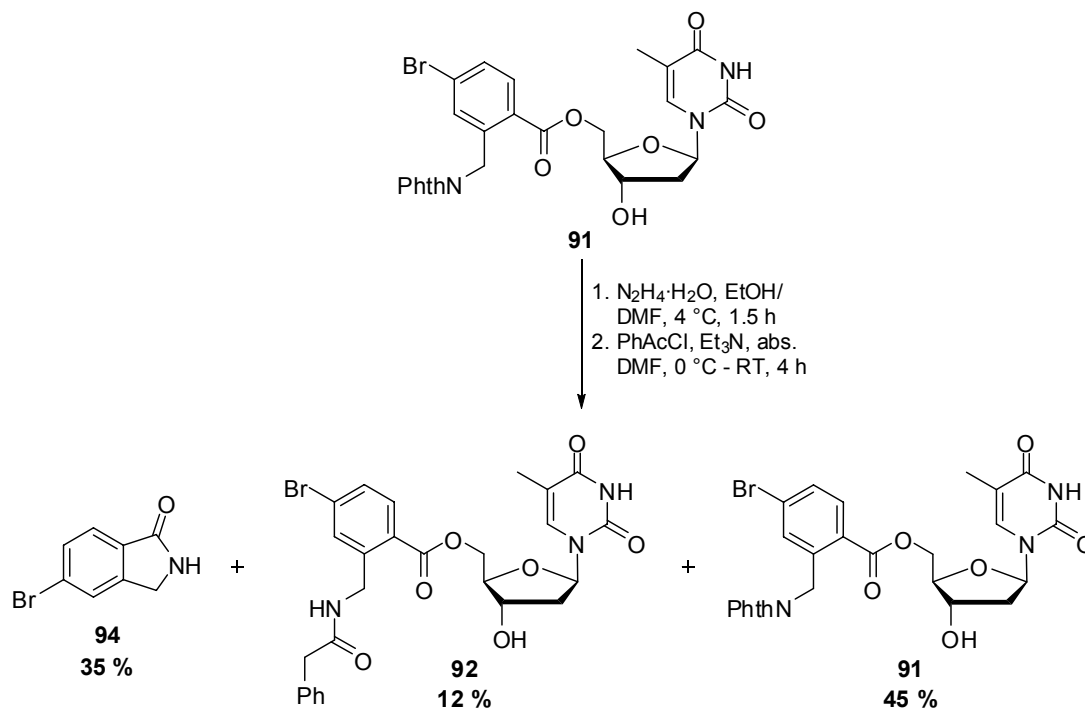
Die Verknüpfung der beiden Verbindungen **85** und **78** zu dem Ester **91** mit BOP-Cl als Aktivator verlief selektiv an der 5'-Position und mit einer guten Ausbeute von 77 %. Schwierigkeiten bereitete aber die Entschützung der Aminogruppe mit Hydrazin. Dabei bestand das Problem nicht in der Spaltung des Esters durch das Reagenz, sondern in der hohen Zyklisierungstendenz des freien Amins **93**. Die Reaktionsmischung wurde

mittels RP-HPLC und anschließender Massenanalyse der einzelnen Peaks untersucht. Die Ergebnisse sind in Abbildung 4-3 gezeigt.



**Abbildung 4-3:** RP-HPLC der versuchten Phthaloyl Entschützung von Verbindung **91**.

Es zeigte sich, dass nach sechs Stunden Reaktionszeit bei Raumtemperatur und 16 Stunden bei 0 °C noch Edukt vorhanden war. Außerdem wurden die Spaltungsprodukte 2'-Desoxythymidin **78** und 5-Bromoisindolin-1-on **94** sowie das freie Amin **93** detektiert. Das erlaubt die Schlussfolgerung, dass die Zyklisierung der Ester-verknüpften Verbindung **93** sehr schnell abläuft, sobald das freie Amin gebildet wurde. Um diese Ergebnisse aus der RP-HPLC Analyse noch zu stützen wurde ein weiterer Versuch durchgeführt, bei dem die Reaktionszeit mit Hydrazin stark verkürzt und anschließend wie geplant mit der Umsetzung mit Phenylacetylchlorid fortgefahren wurde (Schema 4-7).



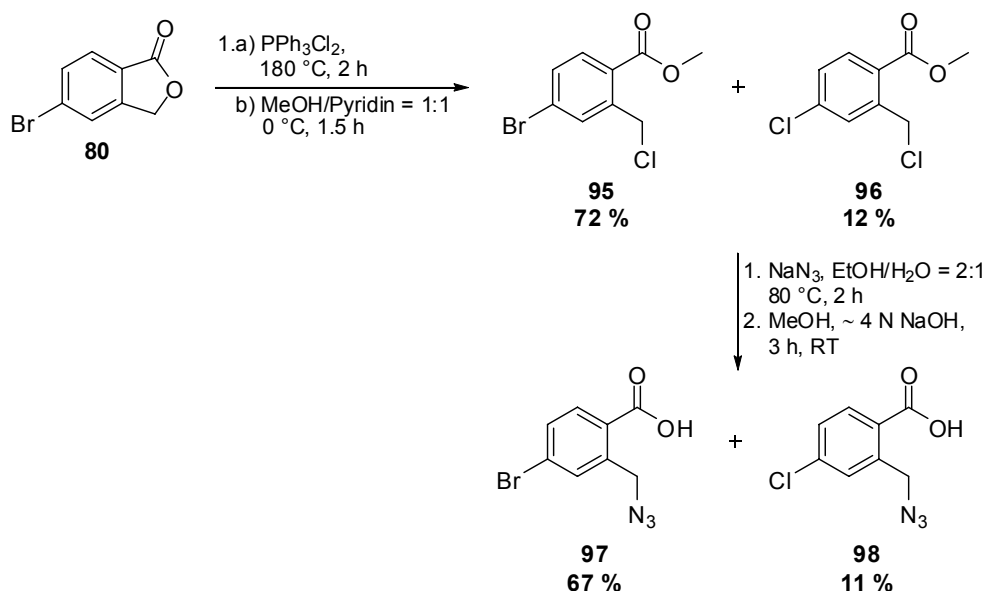
**Schema 4-7:** Versuchte Umsetzung des Esters **91** mit Phenylacetylchlorid.

Das Edukt **91** wurde lediglich 1.5 Stunden bei 4 °C mit Hydrazin behandelt. Die Reaktionsmischung wurde anschließend im Vakuum getrocknet, in trockenem DMF aufgenommen und mit Phenylacetylchlorid umgesetzt. Es wurden die folgenden Verbindungen isoliert: 35 % des Zyklisierungsprodukts **94**, 12 % des gewünschten Produkts **92** und 45 % des Edukts **91**. Der hohe Anteil an Edukt **91** war in der kurzen Reaktionszeit begründet. Das Verhältnis von gewünschtem Produkt **92** zu Zyklisierungsprodukt **94** zeigte allerdings deutlich, dass unter diesen basischen Bedingungen der Ringschluss zu Verbindung **94** und die damit einhergehende Spaltung des Esters und Freisetzung des Nukleosids **78** der bevorzugte Reaktionsweg ist.

Aus diesen Ergebnissen lässt sich als erste Erkenntnis bezüglich der Stabilität der Esterbindung schlussfolgern, dass die Spaltung analog dem erwarteten Mechanismus (siehe Schema 4-1) effizient abläuft. Zu klären blieben die Fragen, ob der Ester-verknüpfte Safety-Catch-Linker trotzdem nach der entwickelten Synthesestrategie (siehe Kapitel 4.1) herstellbar ist und eine ausreichende Stabilität während des Synthesewegs und bei einer Oligonukleotidsynthese aufweist.

Die Alternative zu der *N*-Phthalimid Schutzgruppe war die Maskierung der Aminogruppe durch eine Azidfunktion. Der Vorteil des Azids ist hier die Möglichkeit der Reduktion unter sauren Bedingungen, so dass das freie Amin als das entsprechende

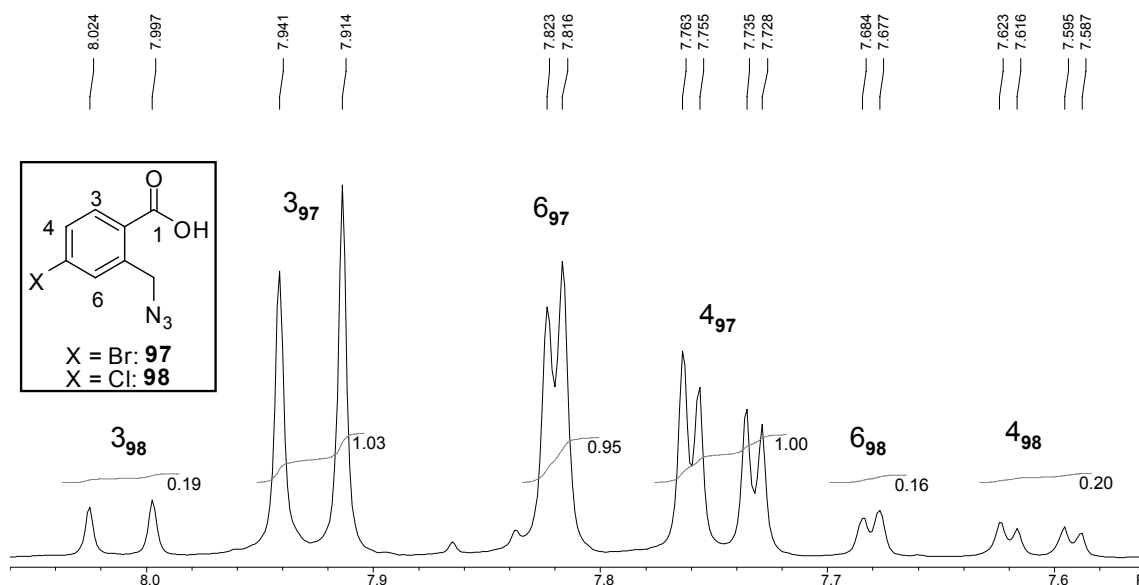
Hydrochlorid erhalten werden kann. Das sollte die Reaktivität der freien Aminogruppe reduzieren und somit die Stabilität erhöhen. Diese für Phthalid bekannte Synthesesequenz zur Öffnung des Lactons und Einführung der Azidgruppe wurde entsprechend der Literatur<sup>[342]</sup> auf 5-Bromophthalid **80** übertragen (Schema 4-8).



**Schema 4-8:** Ringöffnung von 5-Bromophthalid **80** mit Triphenylphosphandichlorid und Umsetzung mit Natriumazid.

Der erste Schritt ist eine Eintopfreaktion, bestehend aus der Öffnung von 5-Bromophthalid **80** mit Triphenylphosphandichlorid und der anschließenden Veresterung mit Methanol. Dies konnte erfolgreich unter den in der Literatur angegebenen Bedingungen durchgeführt werden. Allerdings fand neben der Öffnung des Lactons noch eine Halogen austauschreaktion am Aromaten statt, so dass eine nicht trennbare Mischung des 5-Bromderivats **95** und des 5-Chlorderivats **96** resultierte. In den NMR-Spektren des isolierten Produkts waren die beiden Komponenten sichtbar. Die Ausbeute der jeweiligen Komponente wurde anhand der gut zu unterscheidenden aromatischen Signale aus dem  $^1\text{H}$ -NMR-Spektrum berechnet. So wurden 72 % des gewünschten Produkts **95** und 12 % des Nebenprodukts **96** erhalten. Die Identität der Verbindungen **95** und **96** wurde außerdem durch ESI-Massenspektroskopie bestätigt. Die Synthese wurde mit der Mischung fortgesetzt. In der abschließenden Sonogashira Kupplung sollten beide Halogen-funktionalisierten Aromaten umgesetzt werden, was sich auch bestätigte. Die nukleophile Substitution des aliphatischen Chlorids in **95** und **96** mit Natriumazid und die Esterhydrolyse wurden ohne Aufreinigung des Zwischenprodukts

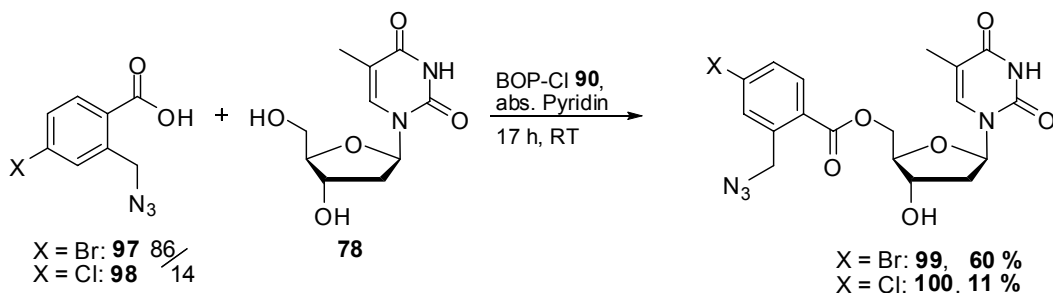
durchgeführt. Zur Aufreinigung der letzten Stufe wurde eine Umkristallisation durchgeführt, jedoch ohne Auswirkung auf die Zusammensetzung des erhaltenen Gemischs aus den Verbindungen **97** und **98**. Auch hier wurde die Ausbeute aus dem  $^1\text{H}$ -NMR-Spektrum zu 67 % an Verbindung **97** und 11 % an Verbindung **98** berechnet. In Abbildung 4-4 ist der Aromatenbereich des  $^1\text{H}$ -NMR-Spektrums der Verbindungen **97** und **98** gezeigt.



**Abbildung 4-4:** Ausschnitt der Aromatenregion aus dem  $^1\text{H}$ -NMR-Spektrum der Mischung aus Verbindung **97** und **98**.

Es ist deutlich zu erkennen, dass jedes Signale zweimal, mit gleicher Multiplizität aber unterschiedlicher Intensität zu sehen ist. Anhand der Integrale wird deutlich, dass es sich um zwei Signalsätze handelt. Die Identität und der Anteil der beiden Komponenten **97** und **98** konnte außerdem durch eine Elementaranalyse der Mischung bestätigt werden. Der Berechnung der erwarteten Elementaranalyse wurden die aus dem  $^1\text{H}$ -NMR Spektrum bestimmten Anteile der Komponenten **97** und **98** zugrunde gelegt. Anzumerken ist hier, dass die gezeigte Reaktionssequenz nur einmal durchgeführt wurde, da sie zu ausreichenden Mengen der gewünschten Azidosäure **97/98** führte. Allerdings sollte bei einer Wiederholung der Reaktion auf die Verwendung des entsprechenden Bromreagenzes (Triphenylphosphandibromid) zurückgegriffen werden, um die Chlorierung am Aromaten zu vermeiden.

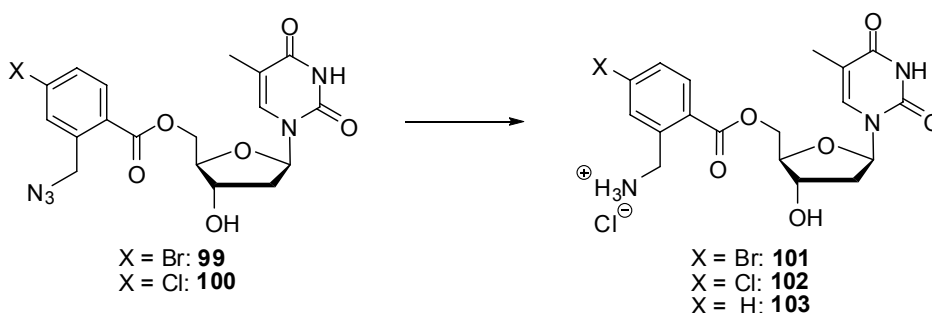
Der nächste Schritt war die Veresterung mit 2'-Desoxythymidin **78** und BOP-Cl **90** als Aktivator wie sie in Schema 4-9 gezeigt ist.



**Schema 4-9:** Veresterung der Mischung der Verbindungen **97** und **98** mit 2'-Desoxythymidin **78**.

Auch nach der Kupplung der Säuren **97** und **98** an 2'-Desoxythymidin **78** war es nicht möglich die beiden Halogenderivate säulenchromatographisch zu trennen. Die Veresterung gelang mit einer Gesamtausbeute von 71 %. Wobei die aus dem  $^1\text{H}$ -NMR-Spektrum bestimmen, einzelnen Ausbeuten bei 60 % für das Bromderivat **99** und 11 % für das Chlorderivat **100** lagen. Der nächste Schritt war die Reduktion der Azidfunktion. Hierzu wurden verschiedene Katalysatoren und Reagenzien unter sauren Bedingungen getestet. Die Ergebnisse sind in Tabelle 4-1 zusammengefasst.

**Tabelle 4-1:** Versuche zur sauren Reduktion des Azids **99/100**.

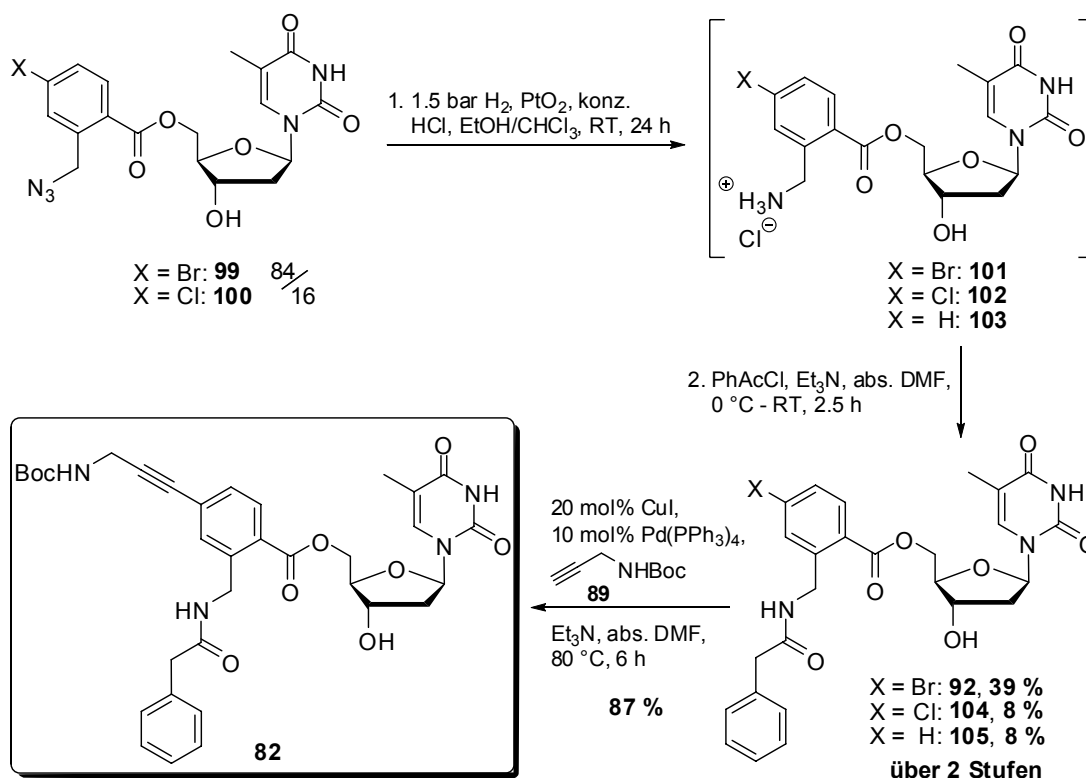


#	Reagenz / Katalysator	Lösungsmittel	t [h]	T	Ausbeute
1	$\text{H}_2$ , 10 % Pd/C (15 mol%)	EtOH/ $\text{CHCl}_3$ /konz. HCl	20	RT	0 % <sup>[a]</sup>
2	$n\text{Bu}_3\text{P}$	THF/10 %ige HCl	20	0 °C - RT	0 % <sup>[b]</sup>
3	$\text{Ph}_3\text{P}$	MeOH/0.5 M HCl	4	80 °C	Spuren <sup>[b]</sup>
4	$\text{H}_2$ , Lindlar (10 mol%)	EtOH/ $\text{CHCl}_3$ /konz. HCl	76	RT	0 % <sup>[c]</sup>
5	$\text{H}_2$ , $\text{PtO}_2$ (10 mol%)	EtOH/ $\text{CHCl}_3$ /konz. HCl	24	RT	90 % <b>101/102</b> <sup>[d]</sup> 10 % <b>103</b> <sup>[d]</sup>

<sup>[a]</sup>Quant. Reduktion zu Verbindung **103**. <sup>[b]</sup>Produktgemisch. <sup>[c]</sup>kein Umsatz. <sup>[d]</sup>Aus  $^1\text{H}$ -NMR Spektrum berechnet.

Als erstes wurde die Reduktion des Azids unter Standardbedingungen (10 % Pd/C) durchgeführt (#1). Um das Hydrochlorid zu erhalten, wurde die Reaktion in einem Lösungsmittelgemisch aus Ethanol und Chloroform durchgeführt. Zusätzlich wurden einige Tropfen konzentrierter Salzsäure zugegeben. Die Azidfunktion wurde unter diesen Bedingungen zwar effizient reduziert, jedoch wurde ausschließlich das zusätzlich dehalogenierte Produkt **103** erhalten. Ein positives Ergebnis aus diesem ersten Experiment war, dass Verbindung **103** die erhoffte Stabilität im Bezug auf die Zyklisierungsreaktion aufwies. Daraufhin wurden zwei alternative Vorschriften unter sauren Bedingungen für die, normalerweise im basischen verlaufende, Staudinger Reduktion untersucht (#2 und #3).<sup>[344,345]</sup> Unter den Bedingungen in #2 konnten keine bekannten Produkte identifiziert werden. In dem Produktgemisch aus #3 konnte zwar das freie Amin in der massenspektroskopischen Analyse nachgewiesen werden, jedoch war außerdem das zyklisierte Produkt **94** sowie eine Reihe unbekannter Produkte enthalten. Außerdem besteht bei der Staudinger Reduktion das Problem der Aufreinigung des Rohprodukts aufgrund des entstehenden, schwer abzutrennenden Phosphanoxids. Da eine Aufreinigung des freienamins nicht möglich war, wurde wieder auf Hydrierungsmethoden zurückgegriffen. Diese ermöglichen eine einfache Abtrennung des Katalysators und damit eine höhere Reinheit des Rohprodukts. Um die Reaktivität bezüglich der in #1 beobachteten Dehalogenierung abzusenken wurde in #4 der deaktivierte Lindlar-Katalysator getestet. Im hier beschriebenen Fall konnte allerdings nach drei Tagen kein Umsatz festgestellt werden. Eine weitere Alternative mit geringerer Gefahr der Dehalogenierung ist die Verwendung von Platindioxid als Katalysator. Durch Einsatz dieses Katalysators in einer 4:1 Mischung aus Ethanol und Chloroform als Lösungsmittel und der Zugabe von 0.5 % konzentrierter HCl konnte die Nebenproduktbildung durch Reduktion des Aromaten schließlich bis auf 10 % verringert und das Produkt **101/102** mit 90 % erhalten werden. Die drei abschließenden Schritte zur Herstellung des Safety-Catch-Linkers **82** sind in Schema 4-10 dargestellt.





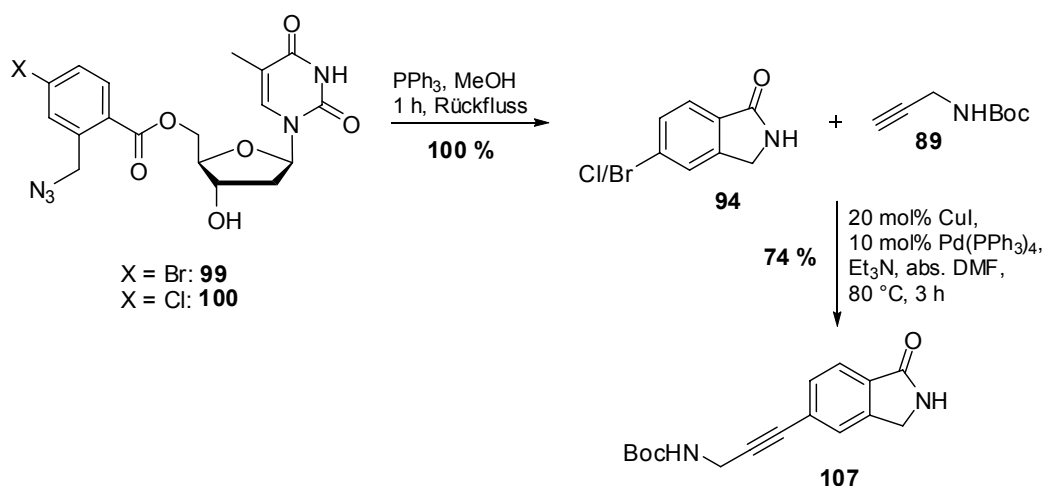
**Schema 4-10:** Synthese des Ester-verknüpften, PGA-spaltbaren Safety-Catch-Linkers **82**.

Analog der Vorgehensweise bei dem Amid-verknüpften Linker **81** wurden die Freisetzung der Aminogruppe und die Einführung des enzymatisch spaltbaren Rests ohne Aufreinigung des freien Amins durchgeführt. Zur hydrogenolytischen Reduktion des Azids wurde, wie Tabelle 4-1 #5 beschrieben, Platindioxid als Katalysator verwendet. Nach Filtration über Celite und Trocknung wurde die Mischung der Hydrochloride **101**, **102** und **103** direkt im zweiten Schritt mit Phenylacetylchlorid umgesetzt. Die einzelnen Ausbeuten der Komponenten der nicht trennbaren Mischung wurden aus dem  $^1H$ -NMR berechnet. So wurden 39 % des Bromderivats **92**, 8 % des Chlorderivats **104** und 8 % des dehalogenierten Produkts **105** erhalten. Die beiden Halogenderivate **92** und **104** konnten in der Sonogashira Kupplung umgesetzt werden, weshalb die Ausbeute der Sonogashira Kupplung auf ihren Anteil bezogen wurde. Sie wurde entsprechend den Bedingungen zur Herstellung von Verbindung **81** bei  $80^\circ C$  durchgeführt. Das nicht umgesetzte, halogenfreie Derivat **105** konnte nach der Sonogashira Kupplung abgetrennt werden und das gewünschte Produkt **82** wurde mit einer sehr guten Ausbeute von 87 % erhalten.

Nachdem nun beide neuen, PGA-spaltbaren Safety-Catch-Linker **81** und **82** erfolgreich hergestellt werden konnten, wurden ihre Spaltbarkeit mit PGA und hydrolytische Stabilität untersucht.

### 4.3 Enzymsspaltung der Linker 81 und 82

Das in den hier beschriebenen Experimenten eingesetzte Enzym war an *Eupergit C*<sup>®</sup> immobilisiert und hatte eine Beladung von 124 U/g. Die verwendeten Spaltungsbedingungen wurden der Literatur entnommen.<sup>[107,311]</sup> So wurde eine 0.05 M NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>/Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>-Pufferlösung mit einem pH-Wert von 7.0 bis 7.5 bei 37 °C verwendet. Aufgrund der geringen Löslichkeit der Verbindungen **81** und **82** wurden außerdem verschiedene organische Lösungsmittel als Cosolventien eingesetzt. Um die zuverlässige Auswertung der Spaltungsexperimente mittels RP-HPLC zu ermöglichen wurde zunächst das erwartete Spaltungsprodukt **107** zur Aufnahme von Referenzchromatogrammen ausgehend von der Verbindung **99/100** hergestellt (Abbildung 4-5).



**Abbildung 4-5:** Synthese des erwarteten Spaltungsprodukts **107**.

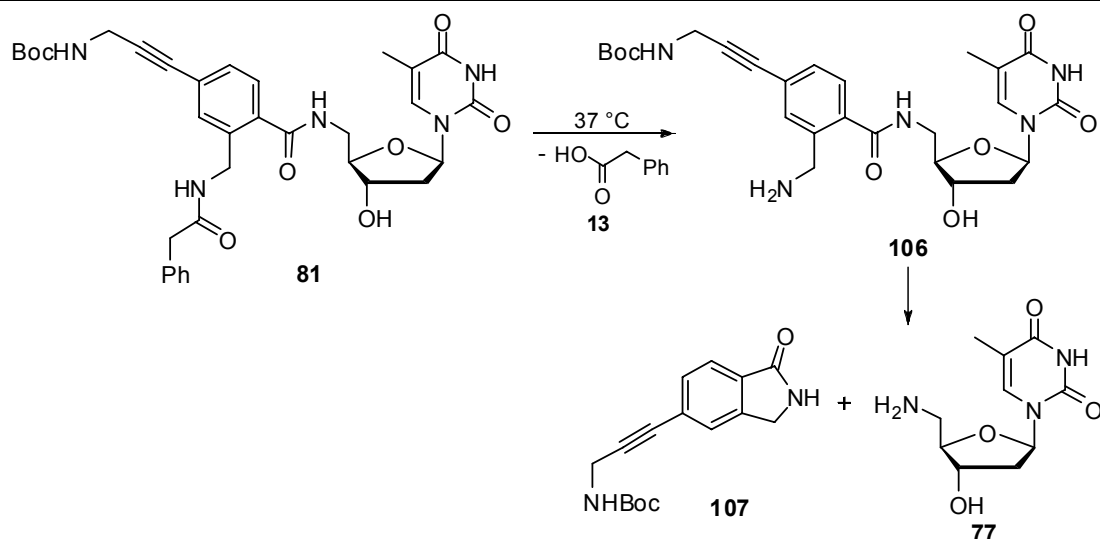
Der Ester **99/100** wurde mit Triphenylphosphan reduziert und durch Erhitzen zum Rückfluss in Methanol direkt zyklisiert. Das halogenierte Zyklisierungsprodukt **94** wurde in quantitativer Ausbeute erhalten. Es wurde dann in einer Sonogashira Kupplung mit *N*-Boc-geschütztem Propargylamin **89** bei 80 °C zum erwarteten Spaltungsprodukt **107** umgesetzt. Die Ausbeute betrug dabei gute 74 %.

Im folgenden Kapitel werden zuerst die Experimente und Ergebnisse der Spaltungsversuche mit dem Amid-verknüpften Safety-Catch-Linker **81** diskutiert.

### 4.3.1 PGA-Spaltung des Amid-verknüpften Safety-Catch-Linkers 81

Die durchgeführten Spaltungsexperimente sind in Tabelle 4-2 zusammengefasst, die erwarteten Spaltungsprodukte sind in der eingefügten Reaktionsgleichung gezeigt.

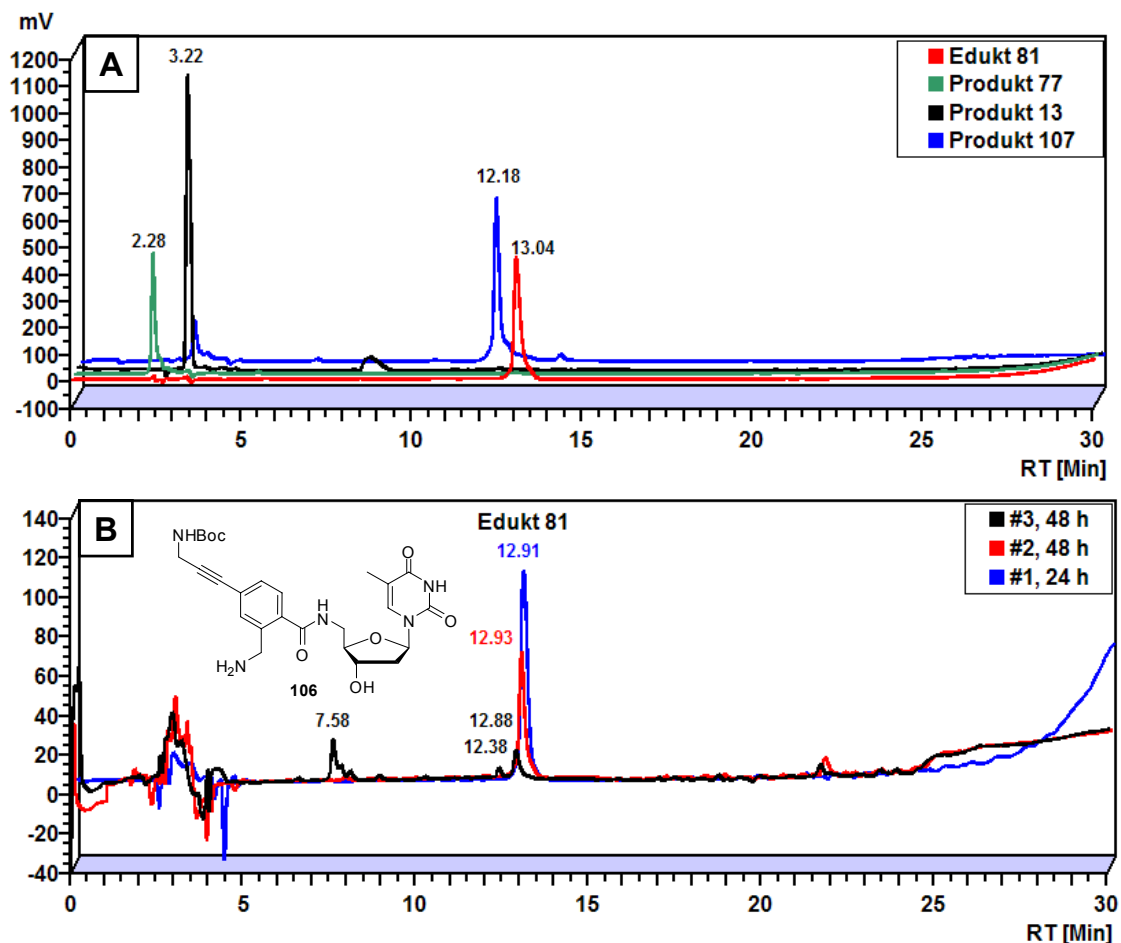
**Tabelle 4-2:** Spaltungsversuche mit PGA und dem Safety-Catch-Linker **81**.



#	Lösungsmittel <sup>[a]</sup>	Enzymmenge [U]	t [h]	Spaltung zu <b>107</b> [%] <sup>[b]</sup>
1	PGA-Puffer/MeOH = 7:3	1	24	0
2	PGA-Puffer/DMF = 9:1	3	48	0
3	PGA-Puffer	3	48	0 <sup>[c]</sup>

<sup>[a]</sup>PGA-Puffer = 0.05 M NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>/Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>-Puffer, pH = 7.5. <sup>[b]</sup>Qualitative Reaktionskontrolle mittels analytischer RP-HPLC. <sup>[c]</sup>In der RP-HPLC Umsatz zu dem freien Amin **106** beobachtet.

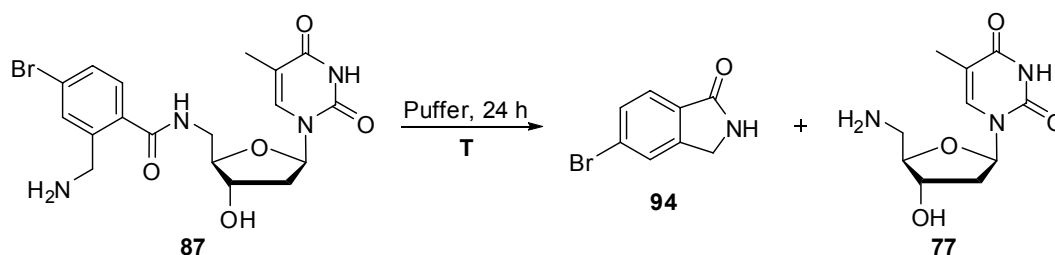
Die Reaktionen #1 und #2 zeigten keinerlei Umsatz des Substrats **81** innerhalb von 24 bzw. 48 Stunden. In Reaktion #3 war zwar ein Umsatz zu sehen, allerdings nicht zu den erwarteten Produkten **107** und **77**, sondern zu dem nicht zyklisierten, freien Amin **106**. Zur Verdeutlichung sind die analytischen RP-HPLC Chromatogramme des Edukts **81** und der erwarteten Produkte **107**, **77** und **13** sowie der Reaktionskontrollen nach 24 bzw. 48 Stunden in Abbildung 4-6 gezeigt.



**Abbildung 4-6:** RP-HPLC Chromatogramme des Edukts **81** und der Produkte **107**, **77** und **13** (A) sowie der Reaktionskontrollen aus Tabelle 4-2 nach 24 bzw. 48 Stunden (B).

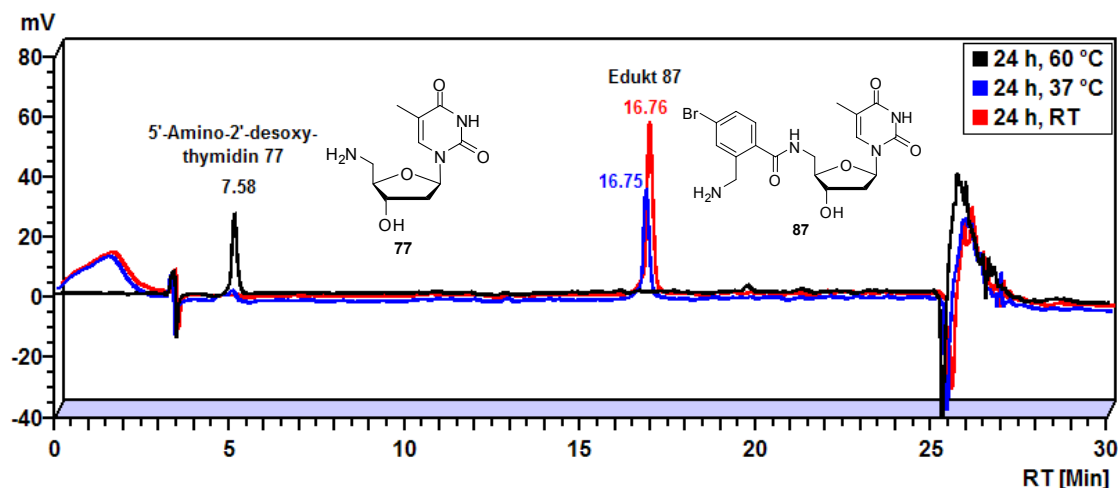
In Abbildung 4-6 A sind die Referenzchromatogramme gezeigt. Das Edukt **81** (rot) wird bei 13.04 Minuten und das Zyklisierungsprodukt **107** (blau) bei 12.18 Minuten eluiert. Die beiden anderen erwarteten Produkte **77** (grün) und **13** (schwarz) werden mit dieser Methode sehr früh eluiert (2.28 bzw. 3.22 Minuten), sodass sie zur Auswertung der Reaktionskontrollen mit dieser HPLC Methode nicht herangezogen werden konnten. Sie mussten mit Hilfe einer alternativen Methode detektiert werden (vergleiche Abbildung 4-7). In Abbildung 4-6 B sind die Chromatogramme der Reaktionskontrollen nach 24 bzw. 48 Stunden abgebildet. Das Chromatogramm von #1 nach 24 Stunden (blau) zeigt keinerlei Umsatz des Edukts. Auch der Reaktionsansatz mit DMF als Cosolvenz zeigt keine enzymatische Spaltung nach 48 Stunden (rot). Das schwarze Chromatogramm (#3 in Tabelle 4-2) zeigt nach 48 Stunden zwei weitere Signale. Eins bei 7.58 Minuten, was laut der Massenanalyse dem freien Amin **106** entspricht. Das

Zweite bei 12.38 Minuten könnte von Spuren des zyklisierten Produkts **107** stammen. Diese Vermutung konnte aber im Massenspektrum nicht eindeutig nachgewiesen werden. Der schlechte Umsatz des Substrats **81** könnte eine Reihe von Gründen haben. Die Aktivität der PGA schien zum einen durch die Zugabe der Cosolventien beeinträchtigt, zum anderen könnte Verbindung **81** ein schlechtes Substrat für die PGA sein. Auch die schlechte Löslichkeit des Safety-Catch-Linkers **81** könnte eine Rolle spielen. Der Nachweis des enzymatisch entschützten aber nicht zyklisierten Produkts ließ allerdings vermuten, dass das Problem in der Stabilität des freien Amins **106** begründet ist. Da der irreversible Zyklisierungsschritt nicht oder nur sehr langsam erfolgt, wird das Gleichgewicht der Reaktion nicht auf die Seite der gewünschten Produkte **107** und **77** verschoben. Um diese Vermutung aufzuklären wurden Zyklisierungsversuche mit Verbindung **87** durchgeführt. Die erwartete Reaktion ist in Schema 4-11 gezeigt.



**Schema 4-11:** Reaktionsgleichung der erwarteten Zyklisierung mit Verbindung **87**.

Die Experimente wurden im Reaktionspuffer der PGA (0.05 M  $\text{NaH}_2\text{PO}_4/\text{Na}_2\text{HPO}_4$ -Puffer, pH = 7.5) bei drei verschiedenen Temperaturen (Raumtemperatur, 37 °C, 60 °C) durchgeführt. Die Inkubationszeit bei der jeweiligen Temperatur betrug 24 Stunden. Die Ergebnisse der RP-HPLC Analytik sind in Abbildung 4-7 gezeigt.



**Abbildung 4-7:** RP-HPLC Chromatogramme der Zyklisierungsversuche mit Verbindung **87** nach 24 Stunden bei Raumtemperatur (rot), 37 °C (blau) und 60 °C (schwarz).

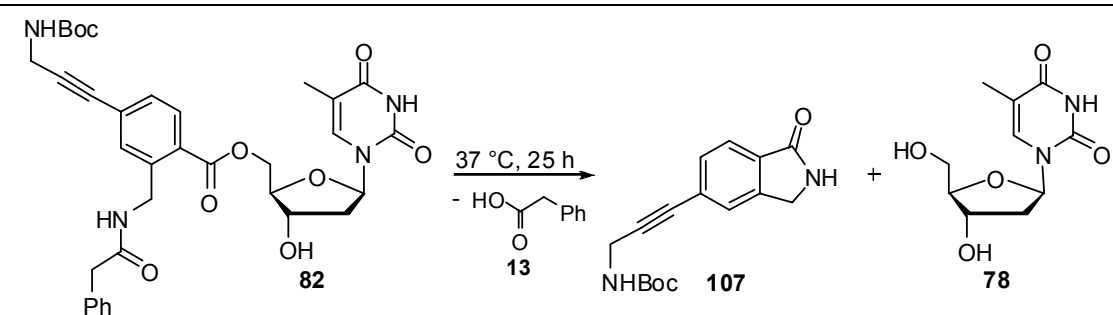
Die Chromatogramme der Versuche bei Raumtemperatur (rot) und 37 °C (blau) zeigten keine Zyklisierung des freien Amins **87** nach 24 Stunden. Bei 60 °C hingegen war nach 24 Stunden kein Edukt mehr detektierbar. Als Produkt wurde 5'-Amino-2'-desoxythymidin **77** gefunden. Das zweite Spaltungsprodukt **94** (siehe Schema 4-11) wird mit der gezeigten Methode erst im Spülschritt eluiert und war daher nicht erkennbar. Die massenspektroskopische Analyse der Reaktionslösung zeigte aber die erwarteten Massen beider Produkte **77** und **94**. Somit konnte gezeigt werden, dass der Amid-verknüpfte Safety-Catch-Linker nicht für potentielle *in vivo* Anwendungen geeignet ist, da die Zyklisierung erst bei 60 °C effektiv erfolgt. Diese Route wurde daher auch bezüglich alternativer enzymatischer Substrate nicht weiter verfolgt. Im folgenden Kapitel werden die Ergebnisse der Spaltungstests mit PGA und dem Ester-verknüpften Safety-Catch-Linker **82** vorgestellt.

#### 4.3.2 Stabilitäts- und Enzymspaltungsexperimente mit dem Ester-verknüpften Linker **82**

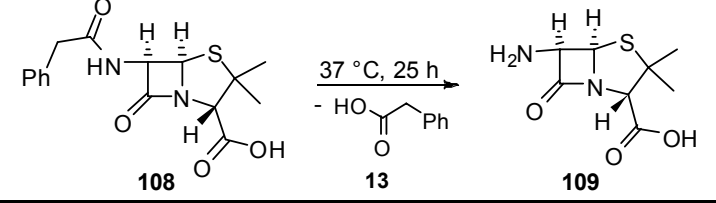
Das Ester-verknüpfte Substrat **82** ist wie der Amid-verknüpfte Safety-Catch-Linker **81** bereits in Methanol schwer löslich. Daher wurde zunächst die Löslichkeit in Millipore Wasser bei 37 °C bestimmt. Dazu wurden 10 mg der Verbindung **82** in 5 mL Millipore Wasser bei 37 °C fünf Stunden lang inkubiert. Nach Abfiltration der ungelösten Bestandteile und Entfernung des Wassers wurde die Masse des Rückstands mit einer Mikrowaage bestimmt. Die so bestimmte Löslichkeit bei 37 °C beträgt 0.045 mg/mL.

Da es sich bei Verbindung **82** um den potentiell labileren Ester handelt, musste eine eventuelle Instabilität in Wasser berücksichtigt werden. Es wurde eine Stabilitätsuntersuchung in Millipore Wasser bei 37 °C über 24 Stunden durchgeführt. Die Ergebnisse der RP-HPLC Analyse zeigten, dass der Ester **82** in Millipore Wasser mindestens 24 Stunden stabil (> 95 %) ist. Die Löslichkeitsbestimmung von Verbindung **82** konnte somit für die Spaltungstests herangezogen werden. Diese wurden in 0.05 M NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>/Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>-Puffer mit einem pH-Wert von 7.0 bei 37 °C durchgeführt und sind in Tabelle 4-3 zusammengefasst.

**Tabelle 4-3:** Enzymatische Spaltungsexperimente mit dem Ester-verknüpften Safety-Catch-Linker **82** und Penicillin G **108** sowie die Stabilitätsexperimente ohne Zugabe von PGA.



---



#	Edukt	Lösungsmittel <sup>[a]</sup>	Enzymmenge [U]	Spaltung zu 107 bzw. 109 <sup>[b]</sup>
1	<b>82</b>	PGA-Puffer/MeOH = 8:2	0.24	80 % <sup>[c]</sup>
2	<b>82</b>	PGA-Puffer/MeOH = 8:2	-	60 % <sup>[d]</sup>
3	<b>108</b>	PGA-Puffer/MeOH = 8:2	0.24	quant.
4	<b>82</b>	PGA-Puffer	0.24	quant. <sup>[c]</sup>
5	<b>82</b>	PGA-Puffer	-	< 10 % <sup>[d]</sup>
6	<b>108</b>	PGA-Puffer	0.24	quant.

<sup>[a]</sup>PGA-Puffer = 0.05 M NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>/Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>-Puffer, pH = 7.0. <sup>[b]</sup>Die Reaktionen wurde mittels RP-HPLC verfolgt. Spaltungsausbeuten wurden relativ zur Probe bei t = 0 h bestimmt. <sup>[c]</sup>Enzymatische Spaltung mit anschließender Zyklisierung zu **107** und **78**. <sup>[d]</sup>Nicht-enzymatische Spaltung zu **107** und **78**.

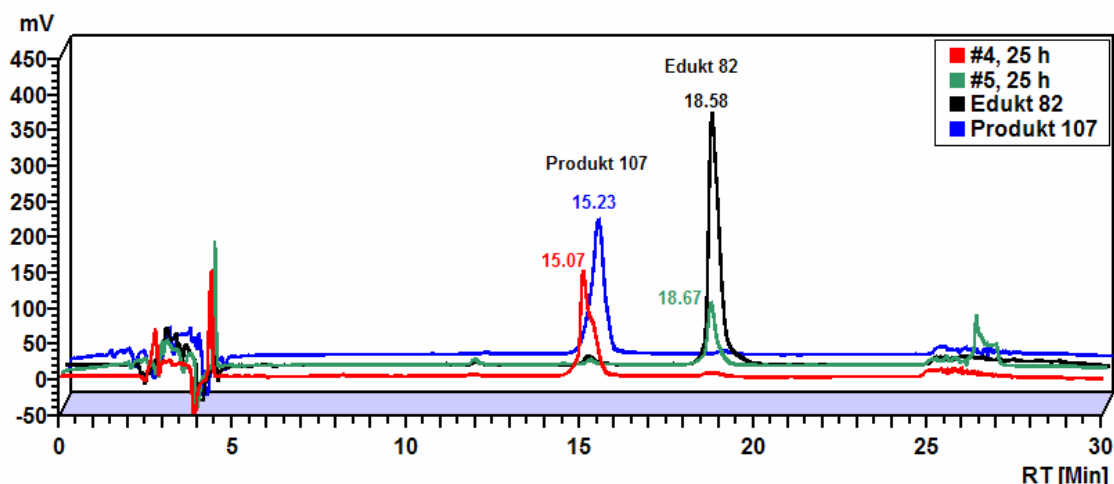
Es wurde eine Versuchsreihe in einem Gemisch aus 80 % PGA-Puffer und 20 % Methanol (#1-#3) und eine Versuchsreihe in reinem PGA-Puffer (#4-#6) durchgeführt. Der Reaktionsverlauf wurde mittels RP-HPLC verfolgt. Bei den Experimenten #1 und #4 handelt es sich um die jeweiligen Spaltungsexperimente des Safety-Catch-Linkers **82** mit PGA. In #1 wurde als Lösungsmittel PGA-Puffer/MeOH = 8:2, in #4 reiner PGA-



Puffer verwendet. Die Experimente #2 und #5 wurden analog zu den Spaltungsexperimenten #1 und #4 durchgeführt, allerdings ohne Zugabe des Enzyms. Sie dienten zur Überprüfung der Stabilität des Linkers **82** im jeweiligen Lösungsmittelsystem. Um die Aktivität der PGA generell und in den jeweiligen Lösungsmittelsystemen zu überprüfen wurde in den Experimenten #3 und #6 die Umsetzung des Referenzsubstrats Penicillin G **108** untersucht.

Im Gegensatz zu den Spaltungsversuchen mit den Amid-verknüpften Safety-Catch-Linker **81** aus Kapitel 4.3.1 zeigten die Ergebnisse mit dem Ester-verknüpften Linker **82** eine erfolgreiche Spaltung der enzymatisch labilen Gruppe **13** mit anschließender Zyklisierung zu **107** und **78**. Nach fünf Stunden war die Umsetzung des Substrats **82** in PGA-Puffer bereits zu 80 % fortgeschritten (#4, RP-HPLC Chromatogramm nicht gezeigt). Die Experimente mit Methanol als Cosolvenz zeigten insgesamt schlechtere Ergebnisse als die in reinem PGA-Puffer. Zum einen war die Spaltung nach 25 Stunden nicht vollständig (#1: 80 %, #4: quant.), zum anderen war die Stabilität des Edukts **82** in Experiment #2 deutlich schlechter als in reinem PGA-Puffer (#5). Es kam zu einer nicht-enzymatischen Spaltung des Substrats **82** im Lösungsmittelsystem PGA-Puffer/MeOH = 8:2 von 60 %. Im Gegensatz dazu war Verbindung **82** in reinem PGA-Puffer fast vollständig stabil (> 90 %, siehe auch Abbildung 4-8). Überraschenderweise wurde trotz der Abwesenheit der PGA in Experiment #2 das Spaltungsprodukt **107** im RP-HPLC Chromatogramm beobachtet. Der Mechanismus dieser nicht-enzymatischen Spaltung wurde später im Zusammenhang mit dem dritten enzymatisch spaltbaren Safety-Catch-Linker **111** aufgeklärt (siehe Kapitel 4.5.2). Er basiert auf einem intramolekularen, nukleophilen Angriff der Amidgruppe des Enzymsubstrats an der Carbonylgruppe des Esters. Die Aktivitätstests mit Penicillin G **108** (#3 und #6) zeigten eine gute Aktivität des Enzyms in beiden Lösungsmittelsystemen. Bezüglich der Effektivität, mit welcher der Safety-Catch-Linker **82** durch die PGA gespalten wird, war die Auswertung der Experimente im PGA-Puffer/MeOH-System nicht eindeutig. Grund hierfür ist, dass die nicht-enzymatische und die enzymatische Spaltung hier mit vergleichbarer Geschwindigkeit ablaufen und zu den gleichen Produkten **107** und **78** führen. Die Untersuchungen in reinem PGA-Puffer hingegen waren aussagekräftig, da in diesem Fall die nicht-enzymatische Spaltung wesentlich langsamer abläuft. Da diese rein wässrigen Bedingungen für potentielle biologische

Anwendungen ohnehin die relevanteren sind wurden keine weiteren Versuche mit Cosolventien durchgeführt. Die RP-HPLC Chromatogramme der Einträge #4 und #5 sind zusammen mit denen des Edukts **82** und des Produkts **107** in Abbildung 4-8 dargestellt.



**Abbildung 4-8:** RP-HPLC Chromatogramme des Edukts **82**, des Produkts **107** und der Einträge #4 und #5 aus Tabelle 4-3.

Das Chromatogramm von #4 (rot) zeigt eine vollständige Spaltung des Edukts **82** und als weiteres Produkt lediglich das Zyklisierungsprodukt **107**. Die anderen erwarteten Spaltungsprodukte 2'-Desoxythymidin **78** und Phenylelessigsäure **13** sind zu polar, um hier eindeutig detektiert zu werden. Daher wurde die Probe der Reaktionslösung mit einer weiteren RP-HPLC Methode (nicht abgebildet) untersucht und so die Anwesenheit von 2'-Desoxythymidin **78** bestätigt. Der Versuch ohne Enzymzugabe (#5, grün) zeigte kaum Spaltungsprodukt **107** (< 10 %) wie es in dem entsprechenden Versuch (#2) mit Methanol als Cosolvenz mit 60 % beobachtet wurde. Damit sind die Spaltung und die sofortige Zyklisierung des freien Amins allein durch die Anwesenheit der PGA und nicht durch nicht-enzymatische Spaltungsreaktionen bedingt.

Es konnte also mit dem PGA-spaltbaren Safety-Catch-Linker **82** gezeigt werden, dass der Ester-verknüpfte Linker den Erwartungen entspricht und stabil genug für weitere Anwendungen ist. Diese Art der Verknüpfung ist damit vielversprechend für die Variation des enzymatischen Substrats und gegebenenfalls Zellaufnahme- und Antisense-Experimente.

## 4.4      **Synthese eines Safety-Catch-Linkers für den Einsatz in Antisense-Experimenten**

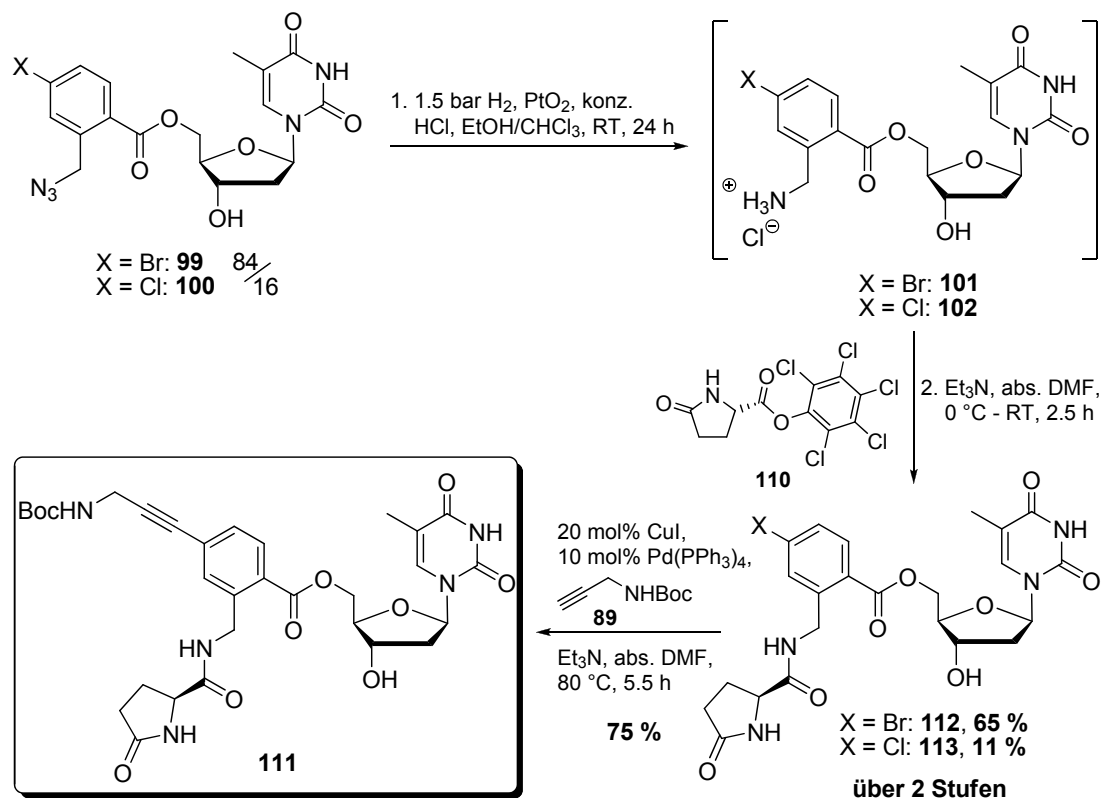
Im Rahmen einer Zusammenarbeit mit *Coley Pharmaceutical GmbH* bestand die Möglichkeit zur Durchführung biologischer Tests bezüglich der Zellaufnahme von Transporter-modifizierten Antisense-Oligonukleotiden in Leberzellen. Dazu sollte im ersten Schritt der Einfluss von Antisense-Oligonukleotiden, die mit dem entwickelten Safety-Catch-Linker modifiziert wurden, auf den „knockdown“ von Apolipoprotein B in einem dort etablierten Hep3B Zellassay getestet werden. Als potentiell Transportermolekül sollte dabei die im Arbeitskreis von *Prof. Engels* bereits durch *Dr. Thomas Lehmann* etablierte Taurocholsäure **25** eingesetzt werden.<sup>[161-163]</sup> Die Anbindung des Transporters an das Oligonukleotid über die Propargylaminingruppe am Linker sollte postsynthetisch erfolgen.

Neben einem passenden Transporter musste außerdem eine geeignete Enzym/ Substrat-Kombination ausgewählt werden. Die folgenden Anforderungen an das Enzym bzw. das Substrat mussten dabei berücksichtigt werden:

- 1) Das Enzym muss in Leberzellen vorhanden und aktiv sein.
- 2) Das Enzym muss für in vitro Spaltungstests einfach zugänglich, das heißt kommerziell verfügbar sein.
- 3) Entsprechend der Erkennungsgruppe der Penicillin G Acylase soll diese klein, leicht zugänglich und mit der entwickelten Synthesestrategie einführbar sein.

Ein Enzym, das alle genannten Ansprüche erfüllt ist die PAP-I, die in Kapitel 3.6.2 bereits vorgestellt wurde. Sie ist in der Leber verfügbar und außerdem aufgrund ihres Einsatzes in der Edman Peptidsequenzierung kommerziell erhältlich und gut untersucht. Es ist außerdem nur ein einfaches, kleines Molekül (L-Pyroglutamat) zur Erkennung des Substrats notwendig. Dieses kann anstelle der Phenylacetylgruppe entsprechend der optimierten Synthesestrategie für den Safety-Catch-Linker **82** eingebaut werden.

Der Safety-Catch-Linker **111** wurde bis auf die aktivierte Carbonylverbindung des enzymatischen Substrats analog dem PGA-spaltbaren Linker **82** hergestellt (siehe Schema 4-10). Anstelle des Säurechlorids wird hier der Pentachlorphenolester **110** des Pyroglutamats verwendet. Die Synthese ausgehend von der Zwischenstufe **99/100** ist in Schema 4-12 gezeigt.



**Schema 4-12:** Synthese des PAP-I-spaltbaren Safety-Catch-Linkers **111**.

Die Reduktion des Azids **99/100** verlief hier besser als bei der Herstellung des PGA-spaltbaren Derivats **82** (siehe Schema 4-10). Im  $^1\text{H}$ -NMR des rohen Hydrochlorids **101/102** waren keine Signale des dehalogenierten Nebenprodukts **103** sichtbar. Auch nach der Umsetzung mit dem Pyroglutamylopentachlorophenylester **110** waren nur zwei Produkte im  $^1\text{H}$ -NMR zu sehen, die den Verbindungen **112** bzw. **113** entsprachen. Die angegebenen Ausbeuten der beiden Halogenderivate **112** und **113** wurden aus dem  $^1\text{H}$ -NMR Spektrum berechnet. Die Ausbeute des Bromderivats **112** war hier mit 65 % im Gegensatz zu 39 % bei dem PGA-spaltbaren Ester **92** deutlich höher. Die gesamte Ausbeute der kupplungsfähigen Verbindungen **112** und **113** betrug 76 %, im Vergleich zu 47 % im Fall der Synthese von Verbindung **82**. Die Sonogashira Kupplung verlief hier mit etwas geringerer Ausbeute von 75 %, verglichen mit Verbindung **82** (87 %). Der PAP-I-spaltbare Safety-Catch-Linker **111** konnte mit einer guten Gesamtausbeute von 26 % über sechs Stufen erfolgreich synthetisiert werden.

In den folgenden Kapiteln werden die Untersuchungen der Eigenschaften dieses Linkers **111** bezüglich Stabilität und enzymatischer Spaltungsfähigkeit diskutiert.

## 4.5 Stabilitäts- und Enzymspaltungsversuche mit dem PAP-I-spaltbaren Safety-Catch-Linker 111

Nach der erfolgreichen Synthese des PAP-I-spaltbaren Safety-Catch-Linkers **111** wurde ein erster Enzymspaltungstest mit dem, zusammen mit dem Enzym, gelieferten PAP-I-Reaktionspuffer durchgeführt. Bei allen enzymatischen Spaltungstests mit dem Linker **111** wurde rekombinante *Pyrococcus furiosus* Pyroglutamyl Aminopeptidase I aus *Escherichia coli* von Takara Bio Inc. eingesetzt. Die Ergebnisse dieses ersten Experiments mit dem PAP-I-spaltbaren Safety-Catch-Linker **111** sind in Tabelle 4-4 dargestellt.

**Tabelle 4-4:** Erste enzymatische Spaltung mit dem Safety-Catch-Linker **111** und PAP-I.

Reaction scheme: Linker **111** (containing 114 and 78)  $\xrightarrow{37\text{ }^{\circ}\text{C}, 3\text{ h}}$  Product **107** + Sugar **78**

#	Lösungsmittel <sup>[a]</sup>	Enzymmenge [mU]	Spaltung zu 107 <sup>[b]</sup>
1	PAP-I-Puffer A	6	quant.
2	PAP-I-Puffer A	-	60 %

<sup>[a]</sup> PAP-I-Puffer A = 50 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>/Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 10 mM DTT, 1 mM EDTA, pH = 7.0. <sup>[b]</sup>Die Reaktionskontrollen erfolgten mittels RP-HPLC, die Spaltungsausbeuten wurden relativ zur Probe bei t = 0 h bestimmt.

In Anwesenheit der PAP-I zeigte sich eine sehr schnelle Umsetzung des Substrats **111** in weniger als 2.5 Stunden (#1). Allerdings wurde ohne Zusatz des Enzyms in Experiment #2 eine ausgeprägte, nicht-enzymatische Spaltung von 60 % beobachtet. Es wurde hier ebenfalls das zyklisierte Produkt **107** in der RP-HPLC detektiert. Wie bei dem Spaltungsexperiment mit dem PGA-spaltbaren Linker **82** mit Methanol als Cosolvenz (siehe Kapitel 4.3.2, Tabelle 4-3, #1-2) ist daher auch hier die Spaltung durch das Enzym nicht eindeutig zu beweisen. Um die Bedingungen für eine selektive, enzymatische Spaltung des Safety-Catch-Linkers **111** zu optimieren wurden deshalb zunächst verschiedene Stabilitätstests in unterschiedlichen Puffersystemen und bei unterschiedlichen pH-Werten durchgeführt.

### 4.5.1 Stabilitätsuntersuchung des Safety-Catch-Linkers 111

Analog zu dem Ester-verknüpften Safety-Catch-Linker **82** (siehe Kapitel 4.3.2) wurde auch für den PAP-I-spaltbaren Linker **111** zunächst die Wasserlöslichkeit bei 37 °C zu 0.137 mg/mL bestimmt. Damit ist das Pyroglutamylderivat **111** deutlich polarer, als das Phenylacetylderivat **82**. Auch hier wurde eine sehr gute Stabilität (> 95 %) nach 24 Stunden in Millipore Wasser bei 37 °C gefunden (siehe Tabelle 4-5, #1). Alle weiteren durchgeführten Stabilitätsexperimente in unterschiedlichen Puffersystemen sind ebenfalls in Tabelle 4-5 zusammengefasst.

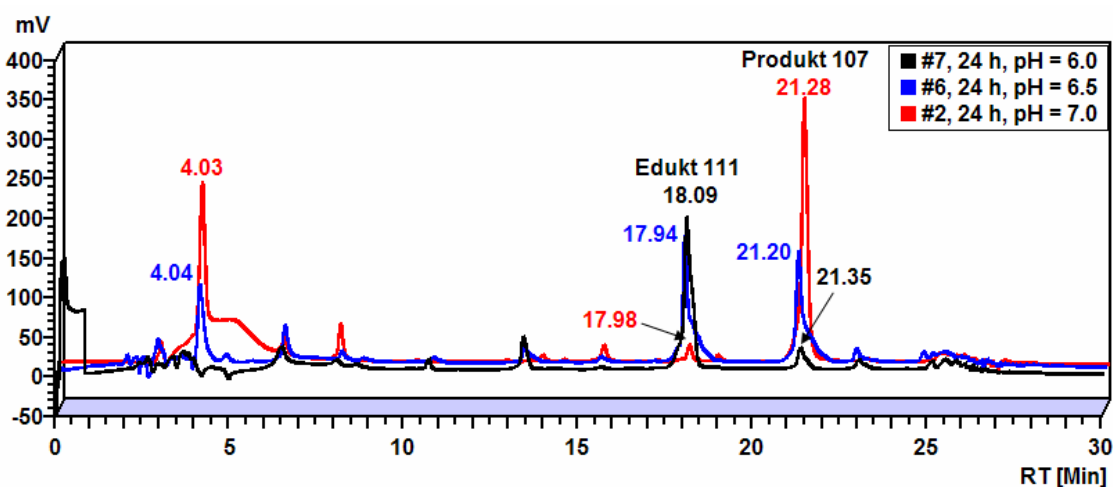
**Tabelle 4-5:** Stabilitätsuntersuchungen des Safety-Catch-Linkers **111**.

#	Pufferlösung	pH-Wert	Spaltung von <b>111</b> <sup>[d]</sup>
1	Millipore Wasser	7.4	< 5 % <sup>[e]</sup>
2	PAP-I-Puffer A <sup>[a]</sup>	7.0	90 % <sup>[e]</sup>
3	PAP-I-Puffer A ohne DTT <sup>[b]</sup>	7.0	75 % <sup>[e]</sup>
4	PAP-I-Puffer B <sup>[c]</sup>	7.0	60 % <sup>[f]</sup>
5	PAP-I-Puffer B <sup>[c]</sup>	6.5	30 % <sup>[f]</sup>
6	PAP-I-Puffer A	6.5	50 % <sup>[e]</sup>
7	PAP-I-Puffer A	6.0	10 % <sup>[e]</sup>

<sup>[a]</sup>PAP-I-Puffer A = 50 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>/Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 10 mM DTT, 1 mM EDTA. <sup>[b]</sup>PAP-I-Puffer A ohne DTT = 50 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>/Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 1 mM EDTA. <sup>[c]</sup>PAP-I-Puffer B = 50 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>/Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 10 mM TCEP, 1 mM EDTA. <sup>[d]</sup>Die Reaktionen wurden mittels RP-HPLC verfolgt. Spaltungsausbeuten wurden relativ zur Probe bei t = 0 h bestimmt. <sup>[e]</sup>Spaltung erfolgte zu **107** und **78**. <sup>[f]</sup>Spaltung erfolgte zu **107** und **78** und zu weiteren, unbekannten Produkten.

Die Ergebnisse bestätigen, dass in bestimmten Puffersystemen ein schneller Zerfall stattfindet. Da PAP-I ein Cystein abhängiges Enzym ist, muss der Puffer ein reduzierendes Reagenz enthalten, dass die Bildung von Disulfidbrücken verhindert. Vergleicht man die Einträge #2 (mit DTT) und #3 (ohne DTT) so kann festgestellt werden, dass das verwendete, reduzierende Reagenz Dithiothreitol (DTT) bei ansonsten identischer Zusammensetzung des Puffers und gleichem pH-Wert zum Zerfall des Safety-Catch-Linkers **111** beiträgt. Da das in der RP-HPLC gefundene Produktmuster

identisch ist, ist nicht klar, worin dies begründet ist. Das deutet nicht auf einen vermuteten nukleophilen Angriff des Schwefels an der Estergruppe hin, da dieser zu anderen Produkten führen müsste. Eine Alternative zur Verwendung von DTT als Reduktionsmittel ist Tris(2-carboxyethyl)phosphan (TCEP). Der Einsatz von TCEP anstatt DTT führte aber zu keiner Verbesserung der Stabilität (#4 und #5). Im Gegenteil, neben der Spaltung zu den bekannten Produkten **107** und **78** wurden auch mehrere unbekannte Zerfallsprodukte in der RP-HPLC detektiert. Die Verringerung des pH-Werts von 7.0 auf 6.5 brachte zwar insgesamt eine Abnahme des spontanen Zerfalls (#4: 60 % bei pH = 7.0, #5: 30 % bei pH = 6.5), das Produktmuster blieb aber komplexer als bei den Versuchen mit den DTT-Puffern und die neuen Verbindungen konnten nicht aufgeklärt werden. Obwohl TCEP hier kein adäquater Ersatz für DTT ist, konnte durch die Experimente #4 und #5 eine deutliche Tendenz zu höherer Stabilität bei niedrigerem pH-Wert festgestellt werden. Die Stabilitäten wurden daher im ursprünglichen Reaktionspuffer der PAP-I (PAP-I-Puffer A) bei verschiedenen pH-Werten verglichen (#2, #6 und #7). Zur Verdeutlichung der Ergebnisse sind die Chromatogramme dieser drei Experimente in Abbildung 4-9 gezeigt.



**Abbildung 4-9:** RP-HPLC Chromatogramme der Einträge #2, #6 und #7 aus Tabelle 4-5.

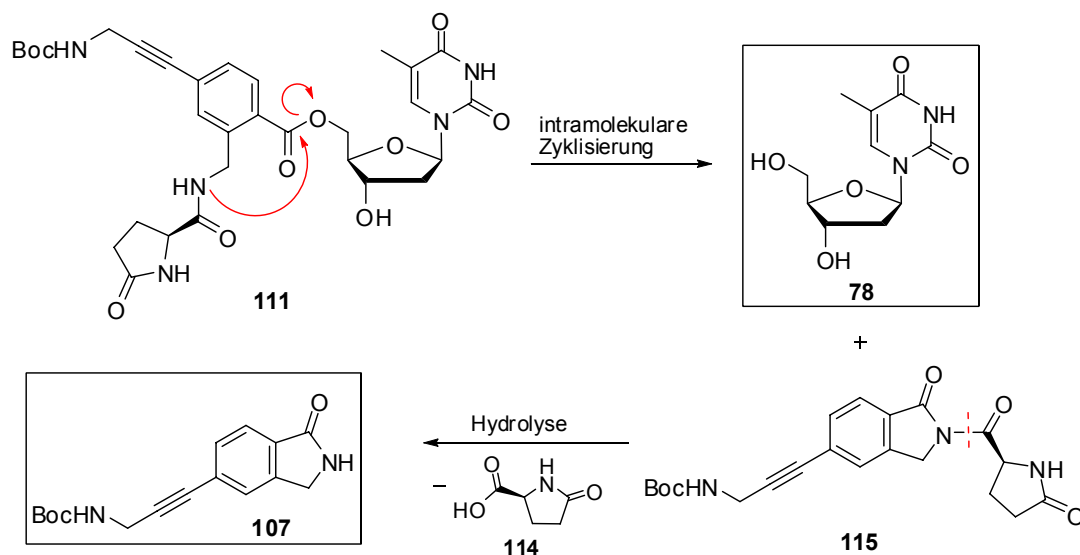
Die deutliche Tendenz zu höheren Stabilitäten bei niedrigerem pH-Wert konnte hier bestätigt werden. So sank der Anteil des Zyklisierungsprodukts **107** von 90 % bei pH = 7.0 auf 50 % bei pH = 6.5 bis auf 10 % bei pH = 6.0. Ein pH-Wert von 6.0 liegt am unteren Rand des pH-Optimums des Enzyms. Daher ist ein pH-Wert von 6.5 der beste Kompromiss zwischen Stabilität des Substrats **111** und optimalen Bedingungen für das Enzym. Da im enzymatischen Spaltungstest bei pH = 7.0 (siehe Tabelle 4-4)

eine sehr schnelle Reaktion ( $< 2.5$  h) beobachtet wurde, wurde auch bei  $\text{pH} = 6.5$  von einem schnellen Umsatz ausgegangen. Die nicht-enzymatische Spaltung des Linkers **111** bei  $\text{pH} = 6.5$  lag nach 2.5 Stunden erst bei  $< 5\%$  (Chromatogramm nicht gezeigt), sodass eine aussagekräftige Untersuchung der enzymatischen Spaltung unter diesen Bedingungen möglich sein sollte.

Bevor die Ergebnisse der enzymatischen Spaltungsexperimente bei  $\text{pH} = 6.5$  vorgestellt werden, soll im nächsten Kapitel erst auf die Untersuchung des nicht-enzymatischen Spaltungsmechanismus eingegangen werden.

#### 4.5.2 Mechanistische Untersuchung der nicht-enzymatischen Spaltung des Safety-Catch-Linkers **111**

Bereits bei der Untersuchung des Ester-verknüpften Safety-Catch-Linkers **82** stellte sich die Frage nach dem nicht-enzymatischen Spaltungsmechanismus, der unerwarteterweise ebenfalls zu den Produkten **107** und **78** des enzymatischen Mechanismus führte. Der vermutete Reaktionsmechanismus des nicht-enzymatischen Zerfalls zum zyklisierten Produkt **107** und 2'-Desoxythymidin **78** verläuft umgekehrt zu dem der enzymatischen Spaltung und ist in Schema 4-13 gezeigt.

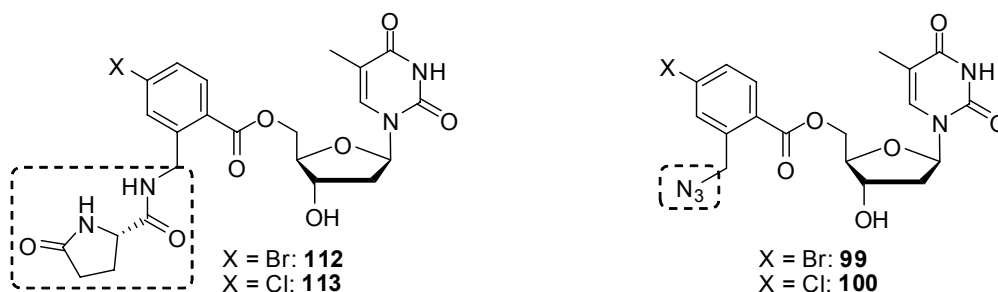


**Schema 4-13:** Vermuteter Mechanismus der nicht-enzymatischen Spaltung des Safety-Catch-Linkers **111**.

Als Auftaktschritt wird eine intramolekulare Zyklisierung zum sekundären Amid **115** unter Freisetzung von 2'-Desoxythymidin **78** postuliert. Die anschließende hydrolytische Spaltung der in Schema 4-13 markierten amidischen Bindung zum

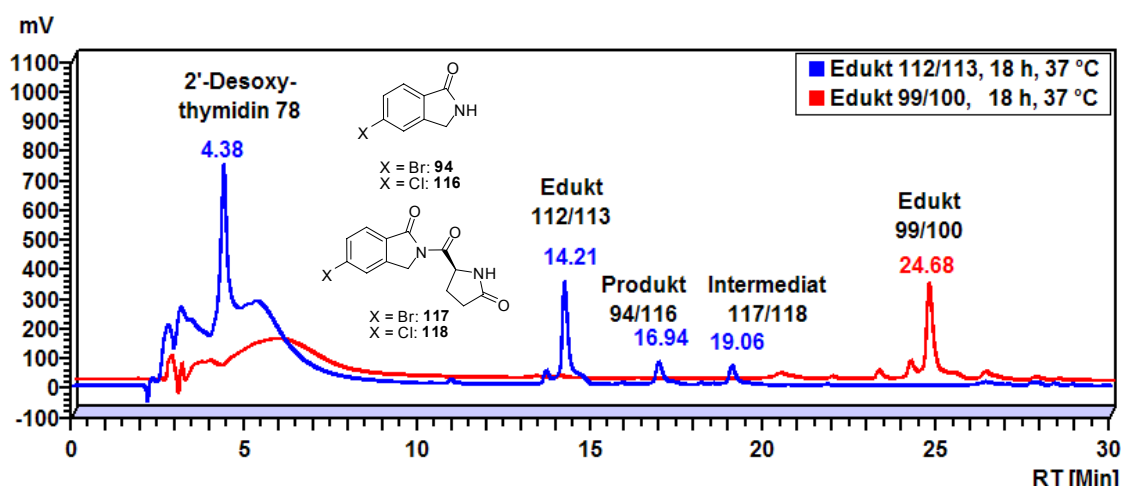


enzymatischen Substrat **114** führt dann zum beobachteten zyklisierten Produkt **107**. Um den postulierten Mechanismus im Fall des spontanen Zerfalls der Verbindung **111** zu beweisen wurde die Stabilität der beiden in Abbildung 4-10 gezeigten Verbindungen im Puffersystem der PAP-I Reaktion (PAP-I-Puffer A, pH = 6.5) untersucht.



**Abbildung 4-10:** Edukte **112/113** und **99/100** für die Untersuchung der nicht-enzymatischen Spaltung.

Da die beiden Verbindungen **112** und **99** nur als Mischung mit ihren jeweiligen Chlorderivaten **113** bzw. **100** erhalten werden konnten, wurden die entsprechenden Mischungen eingesetzt (**99/100** = 84:16, **112/113** = 85:15). Es sollte damit gezeigt werden, dass die spontane Spaltung nicht von einer Hydrolyse der Esterfunktion, sondern von der Anwesenheit der NH-Gruppe im Amid abhängt. Es wurde jeweils eine Lösung der Substanzen **112/113** und **99/100** in einem 9:1 Gemisch aus PAP-I-Puffer, pH = 6.5 und Methanol hergestellt, 18 Stunden bei 37 °C inkubiert und anschließend mittels RP-HPLC und ESI-Massenspektroskopie analysiert. In Abbildung 4-11 sind die RP-HPLC Chromatogramme der beiden Reaktionsansätze gezeigt.



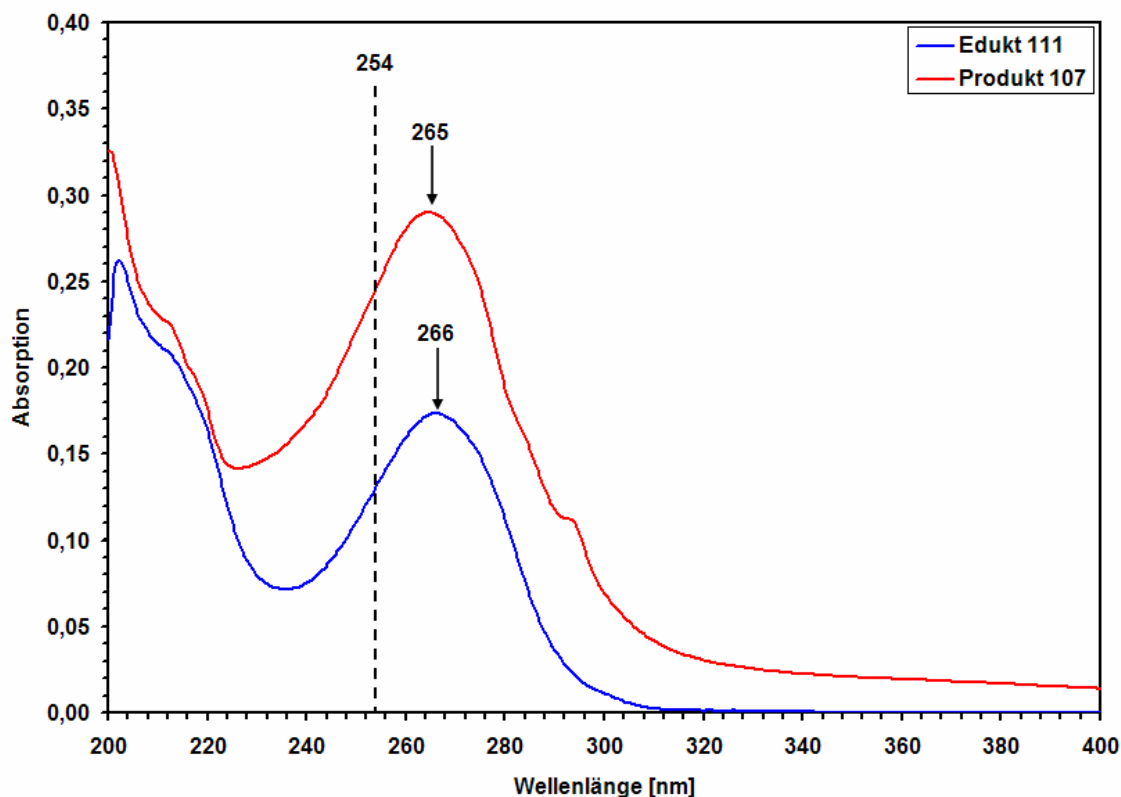
**Abbildung 4-11:** RP-HPLC Chromatogramme der Verbindungen **112/113** (blau) und **99/100** (rot) nach 18 Stunden Inkubation im PAP-I-Puffer A, pH = 6.5 bei 37 °C.

Das RP-HPLC Chromatogramm des Reaktionsansatzes mit dem Azid **99/100** (rot) zeigte nach 18 Stunden keinen Zerfall. Die massenspektroskopische Analyse der isolierten Fraktion bei 24.68 Minuten bestätigte dies. Ein anderes Bild liefert das Chromatogramm des Reaktionsansatzes mit dem Amid **112/113** (blau). Hier sind drei neue Verbindungen zu sehen. Das Signal bei 4.38 Minuten war zwar von Störungen zu Beginn der Aufnahme des Chromatogramms überlagert, das Massenspektrum zeigte aber eindeutig die Masse von 2'-Desoxythymidin **78**. Das Signal bei 14.21 Minuten entsprach wie erwartet dem Amid **112/113**. Die beiden weiteren Fraktionen bei 16.94 und 19.06 Minuten entsprachen der Masse des zyklisierten Produkts **94** und denen der Intermediate **117/118** (siehe Strukturen in Abbildung 4-11). Im Fall des zyklisierten Produkts war das Chlorderivat **116** im Massenspektrum nicht zu sehen, das Chlorderivat **118** des Intermediats **117** hingegen war im Massenspektrum nachzuweisen. Mit diesem Experiment konnte also der vermutete Mechanismus für die nicht-enzymatische Spaltung in doppelter Hinsicht bewiesen werden. Erstens durch die Stabilität der Azido-Verbindung **99/100** unter den untersuchten Bedingungen und zweitens durch den Nachweis der Verbindungen **117/118** als Intermediate. Da der Mechanismus für die Verbindungen **112/113** und damit für den Safety-Catch-Linker **111** nachgewiesen werden konnte, wird auch für die nicht-enzymatische Spaltung des PGA-spaltbaren Linkers **82** ein analoger Mechanismus (vergleiche Schema 4-13) angenommen.

#### **4.5.3 Enzymatische Spaltungsexperimente mit dem Ester-verknüpften Safety-Catch-Linker 111**

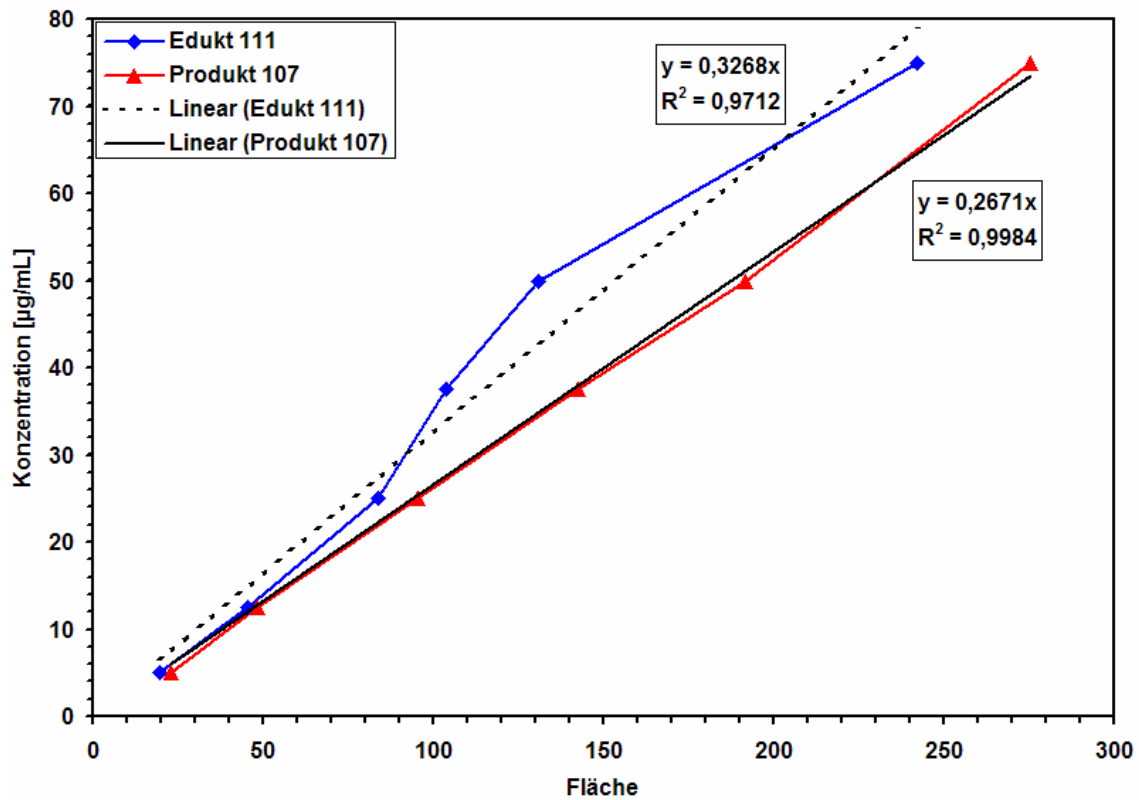
In diesem Kapitel werden nun die Ergebnisse der enzymatischen Spaltungsexperimente mit PAP-I und dem Safety-Catch-Linker **111** als Substrat vorgestellt. Wie die bisher besprochenen Spaltungs- und Stabilitätsuntersuchungen wurden auch diese Experimente mittels RP-HPLC analysiert. Im Unterschied zu den bisherigen, relativ ausgewerteten Daten wurde in diesem Fall eine absolute Auswertung durchgeführt. Um dies zu ermöglichen wurden zunächst Kalibrierkurven des Edukts **111** und des Produkts **107** mittels RP-HPLC aufgenommen. Als erstes wurden dazu UV-Spektren des Edukts **111** und des Produkts **107** gemessen. Das sollte sicherstellen, dass sich die Detektionswellenlänge der verwendeten RP-HPLC Methode am Absorptionsmaximum befindet. In

Abbildung 4-12 sind die UV-Absorptionsspektren des Edukts **111** und des Produkts **107** abgebildet.



**Abbildung 4-12:** UV-Spektren des Edukts **111** und des Produkts **107** zur Bestimmung des Absorptionsmaximums.

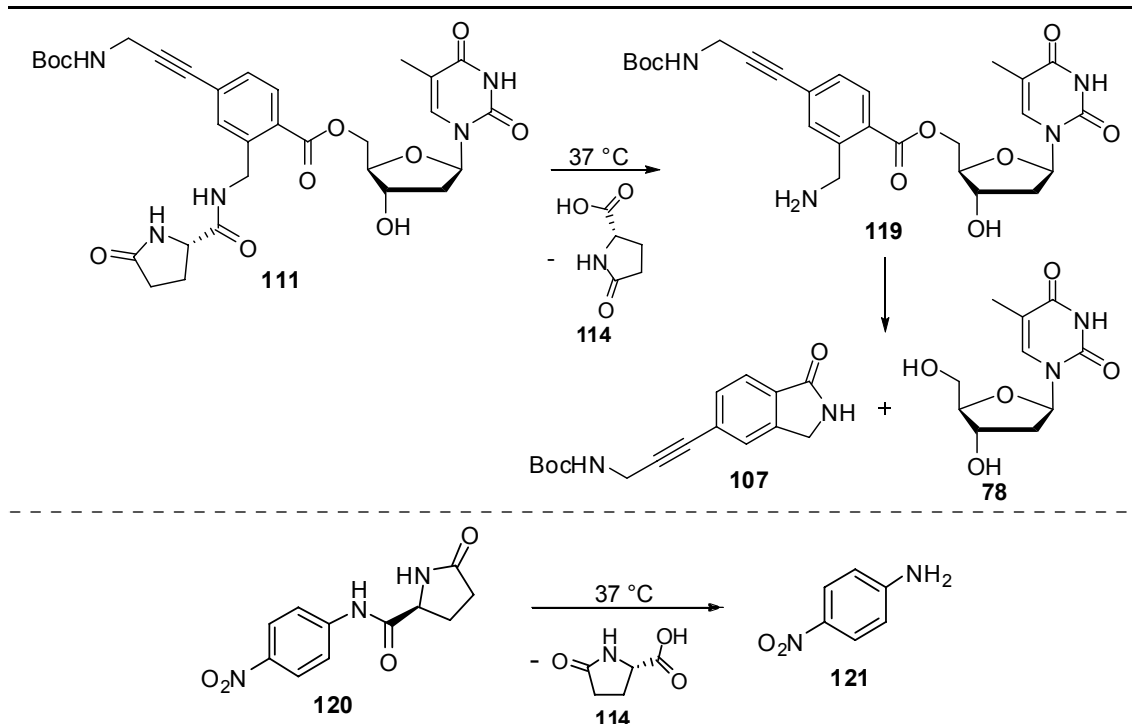
Die UV-Spektren zeigen, dass die Standardwellenlänge (254 nm) des HPLC-Detektors im steilen Bereich der beiden Maxima bei 266 nm (**111**) bzw. 265 nm (**107**) liegt. Die Detektionswellenlänge wurde daher bei der verwendeten RP-HPLC Methode auf 265 nm angepasst. Es wurden anschließend Verdünnungsreihen der beiden Verbindungen **111** und **107** von 75 µg/mL bis 5 µg/mL hergestellt und mittels RP-HPLC gemessen. Dabei erfolgte jeweils eine Doppelbestimmung (gemessene Werte siehe Kapitel 7.4.5.1). In Abbildung 4-13 sind die resultierenden Kalibriergeraden mit der jeweiligen linearen Regression dargestellt.



**Abbildung 4-13:** Kalibrierkurven des Edukts **111** und des Produkts **107** zur Quantifizierung der Stabilitäts- und Spaltungstests in Tabelle 4-6.

Die beiden Kurven zeigen eine gut bis sehr gute Linearität, was auch das Bestimmtheitsmaß  $R^2$  wiedergibt. Sie konnten daher als Kalibriergeraden für die quantitative Auswertung der folgenden Spaltungstests verwendet werden. Die Experimente sind in Tabelle 4-6 zusammengefasst. Außerdem sind die erwarteten (Zwischen)Produkte **114**, **119**, **107** und **78** gezeigt.

**Tabelle 4-6:** Enzymatische Spaltungsexperimente mit dem Safety-Catch-Linker **111** und Pyroglutamyl-4-nitroanilid **120**.



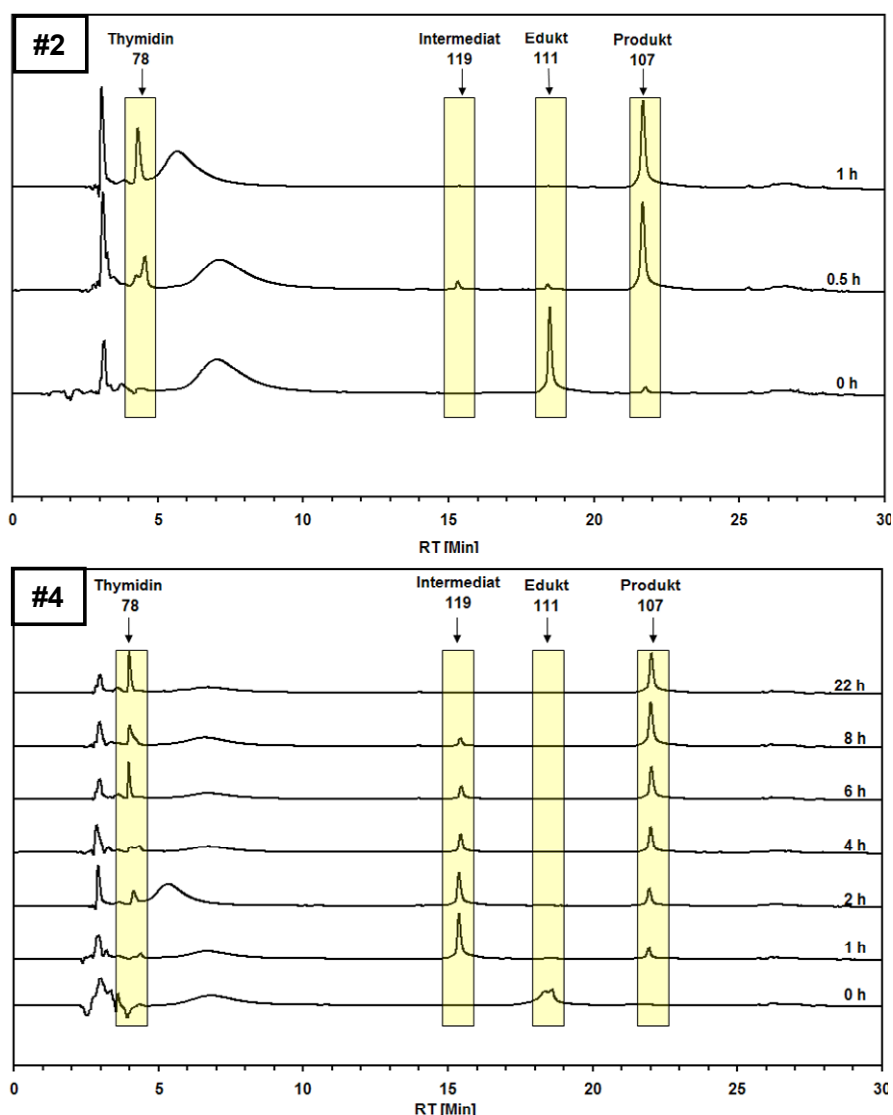
#	Edukt	Pufferlösung <sup>[a]</sup>	pH-Wert	Enzymmenge [mU]	t [h]	Spaltung zu 107 bzw. 121 <sup>[b]</sup>
1	<b>120</b>	PAP-I-Puffer A	6.5	4	24	95 %
2	<b>111</b>	PAP-I-Puffer A	7.4	5	1	94 %
3	<b>111</b>	PAP-I-Puffer A	7.4	-	6	1 h: 22 % <b>107</b> /72 % <b>111</b> 6 h: 52 % <b>107</b> /9 % <b>111</b>
4	<b>111</b>	PAP-I-Puffer A	6.5	5	22	30 Min: 98 % <b>119</b> 22 h: 93 % <b>107</b>
5	<b>111</b>	PAP-I-Puffer A	6.5	-	22	25 % <b>107</b> /43 % <b>111</b>

<sup>[a]</sup>PAP-I-Puffer A = 50 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>/Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 10 mM DTT, 1 mM EDTA. <sup>[b]</sup>Die Reaktionen wurden mittels RP-HPLC verfolgt. Die Spaltungsausbeuten basieren auf den ermittelten Kalibrierkurven des Edukts **111** bzw. des Produkts **107** (Abbildung 4-13).

Es wurden zwei enzymatische Spaltungstests mit dem Linker **111** durchgeführt. Eine Reaktion wurde unter den mit Hilfe der Stabilitätstests (siehe Kapitel 4.5.1) optimierten Bedingungen (#4, pH = 6.5) durchgeführt und zum Vergleich eine Reaktion unter physiologischem pH-Wert (#2, pH = 7.4). Zu jedem enzymatischen Spaltungstest wurde parallel ein Experiment unter identischen Bedingungen ohne das Enzym durchgeführt (#5 und #3), um das Maß der nicht-enzymatischen Spaltung zu bestimmen. Um außerdem die Aktivität des Enzyms unter den optimierten pH-Bedingungen

sicherzustellen wurde ein weiteres Experiment mit dem Referenzsubstrat der PAP-I, Pyroglutamyl-4-nitroanilid **120**, durchgeführt (#1). Die Aktivität definiert die Einheit 1 Unit als die Menge des Enzyms, die 1  $\mu\text{mol}$  Pyroglutamyl-4-nitroanilid **120** in einer Minute bei  $\text{pH} = 7.0$  und  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$  hydrolysiert. Da bei dem Experiment 4 mU des Enzyms eingesetzt wurden und 4013  $\mu\text{mol}$  des Substrats **120** wäre die theoretische Reaktionszeit ungefähr 167 Stunden. Es war also kein kompletter Umsatz innerhalb der 24 Stunden Reaktionszeit zu erwarten. Trotzdem wurde das Substrat zu 95 % in 24 Stunden hydrolysiert, was auf eine sehr hohe Aktivität unter den optimierten Bedingungen schließen lässt.

Bei Betrachtung der Ergebnisse mit der Verbindung **111** als Substrat ist ein sehr schneller Umsatz des Edukts **111** bei beiden pH-Werten zu beobachten (#2 und #4). Der zweite Reaktionsschritt, die Zyklisierung, war jedoch bei  $\text{pH} = 7.4$  (#2) mehr als acht Mal so schnell wie bei  $\text{pH} = 6.5$  (#4). Das intermediäre, freie Amin **119** wurde daher bei  $\text{pH} = 7.4$  kaum detektiert, wohingegen es bei  $\text{pH} = 6.5$  über acht Stunden hinweg in den RP-HPLC Chromatogrammen als Zwischenprodukt zu sehen war. Zur Verdeutlichung der Reaktionsverläufe sind die bei verschiedenen Zeitpunkten gemessenen Chromatogramme der Einträge (#2) und (#4) in Abbildung 4-14 gezeigt.



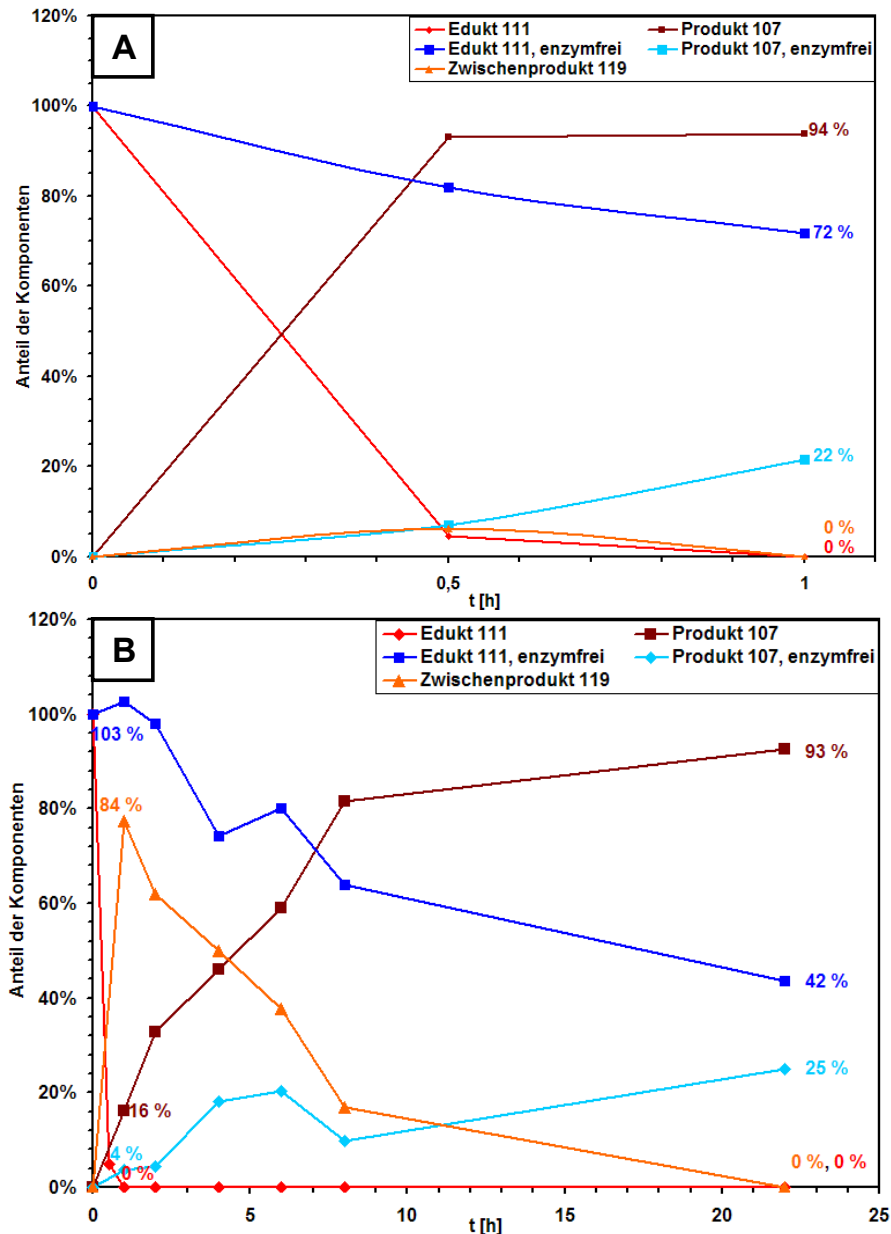
**Abbildung 4-14:** RP-HPLC Chromatogramme zu verschiedenen Zeitpunkten der Reaktionen #2 (pH = 7.4) und #4 (pH = 6.5) aus Tabelle 4-6.

Beim Vergleich der Chromatogramme fallen im vorderen Bereich ein Signal bei einer Retentionszeit von ca. drei Minuten und ein breites Signal zwischen fünf und acht Minuten auf. Diese Signale sind in jedem Chromatogramm zu sehen und sind Hintergrundsignale, die nicht der beobachteten Reaktion zugeordnet worden. Die Bildung von 2'-Desoxythymidin **78** bei ca. vier Minuten ist deutlich zu beobachten, aufgrund der Überlagerungen ist eine quantitative Auswertung in diesem Bereich allerdings nicht möglich. Vergleicht man die zeitlichen Verläufe der Chromatogramme der beiden Reaktionen, so ist festzustellen, dass in beiden Fällen das Edukt **111** nach einer Stunde komplett umgesetzt ist. Bei pH = 7.4 (#2) erfolgt die Umsetzung durch die schnelle Zyklisierung des Intermediats **119** direkt zum Endprodukt **107**. Der

geschwindigkeitsbestimmende Schritt ist hier eindeutig die enzymatische Reaktion selbst. Bei pH = 6.5 (#4) hingegen ist das freie Amin **119** wesentlich stabiler, so dass es als tatsächliches Zwischenprodukt auftritt (1-8 h). Der geschwindigkeitsbestimmende Schritt ist in diesem Fall die Zyklisierung des freien Amins **119** zum Produkt **107**. Das Zielmolekül 2'-Desoxythymidin **78** wird daher bei pH = 6.5 (#4) verzögert zur eigentlichen enzymatischen Spaltung freigesetzt.

Mit Hilfe der Kalibriergeraden (siehe Abbildung 4-13) wurde eine quantitative Auswertung der enzymatischen Spaltungsexperimente mit **111** (**A**: #2 und #4 in Tabelle 4-6) und der Versuche ohne Enzymzugabe (**B**: #3 und #5 in Tabelle 4-6) vorgenommen (Abbildung 4-15). Die Kurven der Spaltungsreaktionen sind dabei in Rottönen gehalten, die der enzymfreien Experimente in Blautönen.





**Abbildung 4-15:** Kinetik der enzymatischen Spaltung und enzymfreien Experimente des Safety-Catch-Linkers 111 bei pH = 7.4 (A) und pH = 6.5 (B).

Betrachtet man die beiden enzymatischen Spaltungsreaktionen (#2, A und #4, B) so weisen sie typische Verläufe für Folgereaktionen auf. Wobei die Kurven der Reaktion bei pH = 7.4 (#2, A) eher quasistationären Bedingungen entsprechen, unter denen die Konzentration des Zwischenprodukts vernachlässigbar ist. Im Fall der Reaktion bei pH = 6.5 (#4, B) hingegen, erreicht die Konzentration des Zwischenprodukts nach einer Stunde sehr schnell sein Maximum und weist auch nach acht Stunden noch eine Konzentration von 18 % auf. Der sehr schnelle Abfall der Eduktkonzentration in beiden Fällen deutet außerdem darauf hin, dass ein vorgelagertes Gleichgewicht keine Rolle

spielt. Insgesamt kann man aus den Experimenten schlussfolgern, dass die Reaktionsgeschwindigkeit der enzymatischen Reaktion im untersuchten Bereich nicht vom pH-Wert der Pufferlösung abhängt. Die Reaktionsgeschwindigkeit des zweiten Schritts hängt dagegen stark vom pH-Wert ab. Das führt dazu, dass die Reaktion im physiologischen pH-Wert (7.4) nach einer Stunde beendet ist, während die Reaktion bei pH = 6.5 erst zwischen 8 und 22 Stunden ihren Endpunkt hat. Um die Werte beider Reaktionen besser vergleichen zu können sind die Werte nach einer Stunde im Diagramm von #4 (B) angegeben.

In beiden Fällen wurden am Ende der Reaktion nach einer bzw. 22 Stunden nur 94 % bzw. 93 % der theoretischen Produktkonzentration erhalten. In den RP-HPLC Chromatogrammen waren aber keine definierten Nebenprodukte zu erkennen. Neben dem prinzipiellen Messfehler könnten auch eventuelle, von den Hintergrundsignalen überlagerte, Nebenprodukte Ursache für die fehlenden 6 % bzw. 7 % sein. Ein weiterer Grund könnten nicht dissoziierte Enzym-Substrat-Komplexe sein.

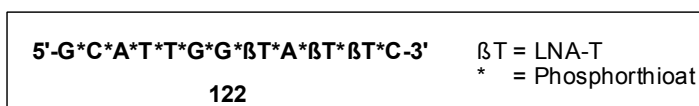
Die Analyse der enzymfreien Experimente zeigte wie erwartet eine stärkere nicht-enzymatische Spaltung bei pH = 7.4. So wurden nach einer Stunde bereits 22 % des Zyklisierungsprodukts **107** gefunden. Der Anteil des Edukts hatte um 28 % abgenommen. Die Differenz von 6 % war das Zwischenprodukt **115**, was aus nicht abgebildeten RP-HPLC Chromatogrammen ersichtlich war. Im Fall des Experiments bei pH = 6.5 war nach einer Stunde kein Zerfall zu beobachten. Nach 22 Stunden wurden 25 % des Zyklisierungsprodukts **107** gefunden. Das Edukt hatte allerdings um 58 % abgenommen. Die fehlenden 23 % konnten hier nicht mit dem Intermediat **115** erklärt werden. Dieses war zwar im RP-HPLC Chromatogramm sichtbar, jedoch in zu geringer Intensität (< 10 %). Es scheint daher noch weitere Zerfallswege zu geben. Eine Möglichkeit wäre nach wie vor der Verlauf über die Hydrolyse des Esters, obwohl dafür bisher noch keine Hinweise gefunden wurden. Die entstehenden, polaren Produkte wären mit der verwendeten RP-HPLC Methode nicht eindeutig zu erkennen.

Zusammenfassend bleibt festzuhalten, dass unter den optimierten Pufferbedingungen eindeutig gezeigt werden konnte, dass der Safety-Catch-Linker **111** ein sehr gutes Substrat für die PAP-I ist und sehr schnell durch sie gespalten wird. Es konnte durch das Vergleichesexperiment bei pH = 7.4 außerdem gezeigt werden, dass die Geschwindigkeit der Spaltungsreaktion im untersuchten pH-Bereich nicht beeinflusst

wird. Es besteht aber eine starke Abhängigkeit der Geschwindigkeit des Zyklisierungsschritts von dem pH-Wert. Nachdem die enzymatische Spaltung und die Freisetzung des Zielmoleküls am Safety-Catch-Linker **111** untersucht wurden, erfolgte nun als letzter Schritt der Einbau in ein Oligonukleotid zur Durchführung von ersten Tests bezüglich des Einflusses auf die Antisense-Aktivität.

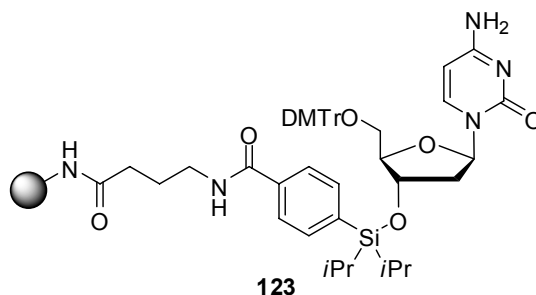
## 4.6 Einbau des Safety-Catch-Linkers 111 in potentielle Antisense-Oligonukleotide

Zur Bestimmung einer geeigneten Antisense-Sequenz wurden durch *Dr. Eugen Uhlmann* und seine Mitarbeiter bei *Coley Pharmaceutical GmbH* eine Reihe unterschiedlicher Oligonukleotide getestet. Bei allen evaluierten Sequenzen handelte es sich um Vollthioate, die zusätzlich zur Erhöhung der Bindungsaffinität LNA-Nukleotide enthielten. Der Grad der Antisense-Wirkung sollte im mittleren Bereich liegen, so dass positive sowie negative Einflüsse der Modifikationen deutlich messbar sind. Des Weiteren sollte die Sequenz zur Vereinfachung der Vorbereitungen nur 2'-Desoxythymidin LNA-Nukleotide enthalten, da die 2'-Desoxythymidin Phosphoramidite von vornherein keine Schutzgruppen an der Baseneinheit tragen. Es wurde das folgende, optimierte 12mer **122** verwendet (Abbildung 4-16).



**Abbildung 4-16:** Optimiertes 12mer Antisense-Oligonukleotid **122**.

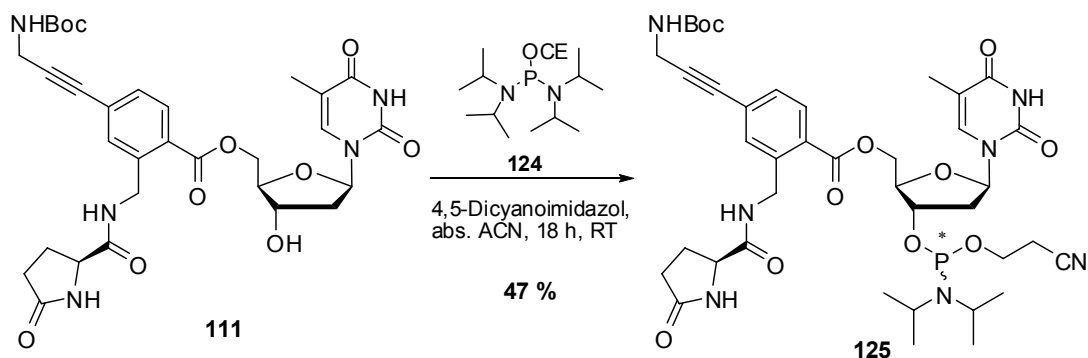
Der Ester-verknüpfte Safety-Catch-Linker **111** ist mit starken Basen, vor allem in wässriger Umgebung, nicht kompatibel. Daher ist es nicht möglich die Standardbedingungen für die Phosphoramidit-basierte Oligonukleotidsynthese anzuwenden, da dort Ammoniak als Reagenz zur Entschützung und Spaltung von der festen Phase eingesetzt wird.<sup>[10,11]</sup> Auch ist der Safety-Catch-Linker **111** nicht stabil in 0.5 M methanolischem K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (siehe Kapitel 7.4.3), womit die als „ultramild“ bekannte Synthesemethode ebenfalls nicht angewendet werden kann.<sup>[85]</sup> Es wurde daher auf eine neue, von *Sekine et al.* entwickelte und bereits sehr gut untersuchte schutzgruppenfreie Methode zurückgegriffen.<sup>[87-89,328]</sup> Diese wurde in Kapitel 3.6.3 bereits vorgestellt. Von den beiden Linkern, von *Ohkubo et al.* die für diese Methode entwickelt wurden,<sup>[88,89]</sup> wurde im Rahmen dieser Arbeit der Linker **7** verwendet, da der entwickelte Safety-Catch-Linker **111** in vorangehenden Tests eine bessere Stabilität in 0.2 M Et<sub>3</sub>N·3HF, als in 1 M TBAF·AcOH zeigte (siehe Kapitel 7.4.3). Der benötigte Polystyrolträger **123** mit dem Linker **7** und 5'-DMTr geschütztem 2'-Desoxycytidin als erstes Nukleosid (vergleiche Zielsequenz in Abbildung 4-16) wurde freundlicherweise von *Dr. Akihiro Ohkubo* zur Verfügung gestellt (Abbildung 4-17).



**Abbildung 4-17:** Verwendeter Polystyrolträger **123** mit dem Linker **7** und 5'-DMTr geschütztem 2'-Desoxycytidin.

#### 4.6.1 Präparative Vorbereitungen der Oligonukleotidsynthese

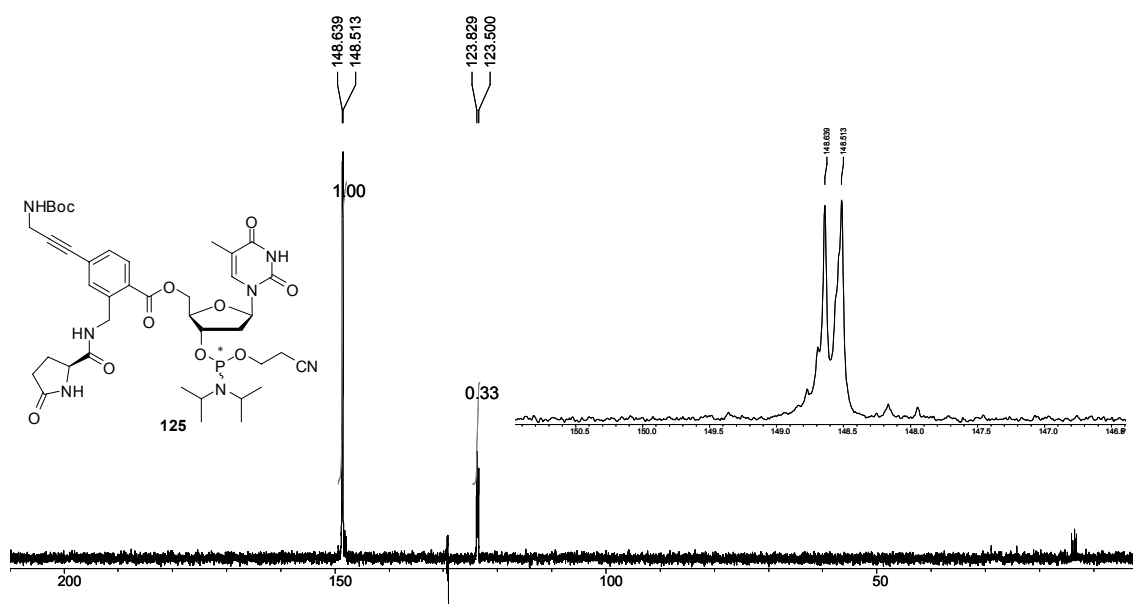
Da die benötigten schutzgruppenfreien Phosphoramidite sowie weitere benötigte Reagenzien nicht kommerziell erhältlich sind, mussten einige synthetische Vorbereitungen für die Oligonukleotidsynthese getroffen werden. Außerdem musste auch der Safety-Catch-Linker **111** noch in das entsprechende Phosphoramidit überführt werden und die Taurocholsäure für die postsynthetische Kupplung aktiviert werden. Zunächst wurde das Phosphoramidit des Safety-Catch-Linkers **111** hergestellt. Dazu wurde *N,N,N,N*-Tetraisopropyl-*O*-cyanoethyl-phosphoramidit **124** als Phosphorylierer und 4,5-Dicyanoimidazol als Base verwendet (Schema 4-14).



**Schema 4-14:** Synthese des Phosphoramidits **125**.

Meist werden Phosphoramiditsynthesen in trockenem Dichlormethan als Lösungsmittel durchgeführt. Das war hier nicht möglich, da sich das Edukt **111** kaum darin löst. Auch in trockenem Acetonitril ist die Löslichkeit nicht sehr hoch, so dass trotz der Verwendung von 50 mL Lösungsmittel für eine Menge von 300 mg des Edukts **111** ungelöste Rückstände blieben. Es konnte aber während der Reaktion beobachtet werden, dass sich die ungelösten Bestandteile nach und nach auflösten. Die Ausbeute war mit 47 % nur mittelmäßig aber das Phosphoramidit konnte in ausreichender

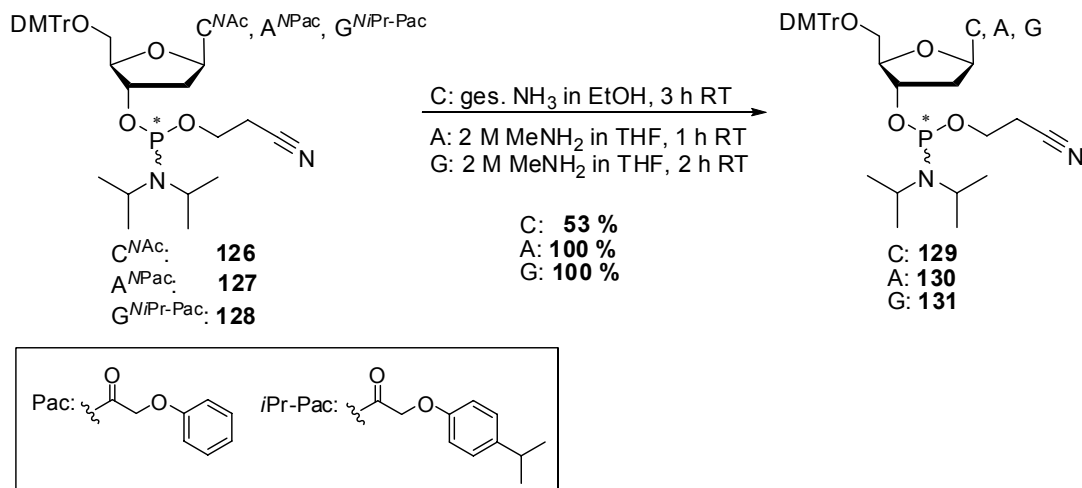
Reinheit erhalten werden. In Abbildung 4-18 ist das  $^{31}\text{P}$ -NMR der Verbindung **125** gezeigt.



**Abbildung 4-18:**  $^{31}\text{P}$ -NMR Spektrum des Phosphoramidits **125**.

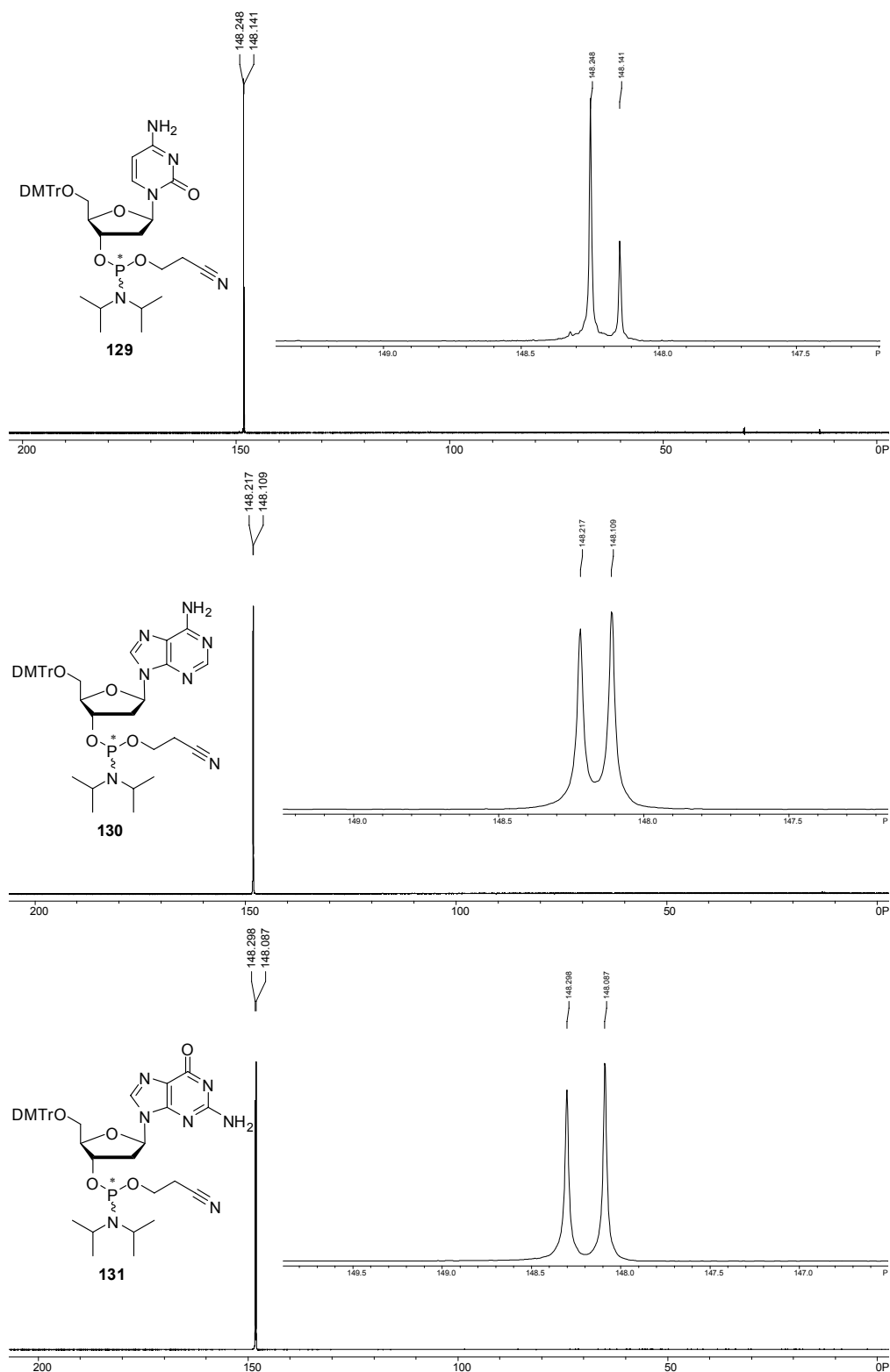
Das Phosphoramidit **125** zeigte wie erwartet zwei deutliche Signale der beiden Diastereomere, die aus dem stereogenen Zentrum am Phosphor resultieren, bei 148.513 und 148.639 ppm. Bei 123.500 und 123.829 ppm sind noch unbekannte Signale als Verunreinigungen zu sehen. Das Phosphoramidit **125** wurde trotzdem ohne weitere Aufreinigungsschritte verwendet.

Zur Entschützung der kommerziell erhältlichen 2'-Desoxycytidin, 2'-Desoxyadenosin und 2'-Desoxyguanosin Phosphoramidite **126**, **127** und **128** wurde die von *Ohkubo et al.* entwickelte Methode angewandt.<sup>[330]</sup> Dabei ist sowohl die Anwendung von Ammoniak, als auch von Methylamin als Entschützungsreagenz beschrieben. Der 2'-Desoxythymidin Phosphoramiditbaustein enthält keine Aminoschutzgruppe und kann daher direkt verwendet werden. Die Entschützung der drei anderen Phosphoramidite **126**, **127** und **128** ist in Schema 4-15 gezeigt.



**Schema 4-15:** Entschützung der Phosphoramidite **126**, **127** und **128**.

Im Fall des 2'-Desoxycytidin Phosphoramidits **126** wurde eine ethanolische Ammoniaklösung verwendet. In der Literatur ist für eine methanolische Ammoniaklösung eine Reaktionsdauer von zwei Stunden beschrieben,<sup>[330]</sup> hier war der Umsatz aber nach drei Stunden noch nicht vollständig. Die Reaktion wurde dennoch abgebrochen und es wurden nach Flash-Säulenchromatographie 53 % des entschützten Phosphoramidits **129** und 30 % des Edukts **126** isoliert. Für die beiden anderen Entschützen wurde dann 2 M Methylamin-Lösung in THF verwendet. Dieses Reagenz wird in der Literatur<sup>[330]</sup> bevorzugt und auch hier wurden in sehr kurzer Zeit quantitative Ausbeuten der entschützten Phosphoramidite **130** und **131** erhalten. Die  $^{31}\text{P}$ -NMR Spektren der entschützten Phosphoramidite **129**, **130** und **131** sind in Abbildung 4-19 gezeigt.



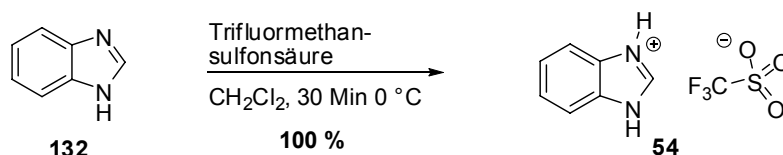
**Abbildung 4-19:**  $^{31}\text{P}$ -NMR Spektren der entschützten Phosphoramidite **129**, **130** und **131**.

Wie aus den  $^{31}\text{P}$ -NMR Spektren ersichtlich ist, konnte die Entschützung und die anschließende Säulenchromatographie ohne Verlust der Phosphoramiditqualität



durchgeführt werden. Die vollständige Entfernung der Schutzgruppen wurde durch  $^1\text{H}$ -NMR Spektroskopie und ESI-Massenspektroskopie bestätigt. Die Phosphoramidite wurden nach gründlicher Trocknung im Vakuum für die schutzgruppenfreie Oligonukleotidsynthese eingesetzt.

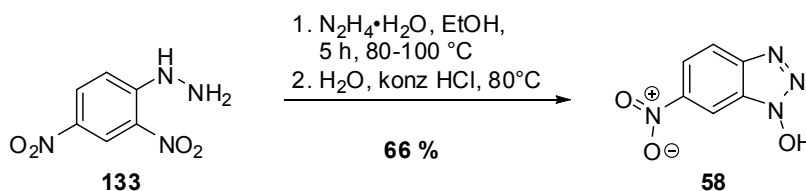
Der benötigte Aktivator **54** ist einfach durch Rühren von Benzimidazol **132** in Dichlormethan mit Trifluormethansulfonsäure bei 0 °C herstellbar (Schema 4-16).<sup>[346]</sup>



**Schema 4-16:** Synthese des Aktivators Benzimidazolium Triflat (BIT) **54**.

Nach Filtration und Trocknung im Vakuum wurde das Salz **54** in quantitativer Ausbeute erhalten.

Das Reagenz zur Spaltung der unerwünschten P-N-Bindungen wurde anhand einer Vorschrift aus dem Jahr 1907 synthetisiert (Schema 4-17).<sup>[347]</sup>

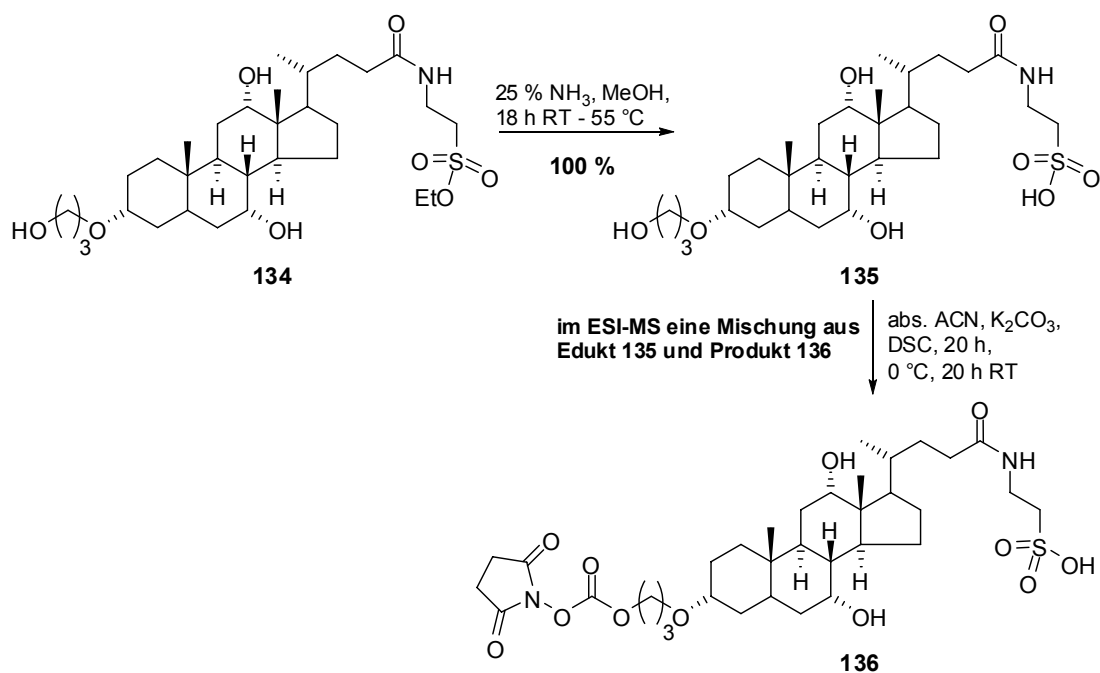


**Schema 4-17:** Synthese des Spaltungsreagenzes 1-Hydroxy-6-nitrobenzotriazol ( $\text{HO}^n\text{Bt}$ ) **58**.

Als Edukt wurde dabei 2,4-Dinitrophenylhydrazin **133** verwendet, das mit einem Überschuss an Hydrazin Monohydrat in Ethanol auf 80-100 °C erhitzt wurde, bis eine dunkelrote Lösung entstanden war. Das Ethanol wurde soweit möglich im Vakuum entfernt, die wässrige Lösung mit demineralisiertem Wasser verdünnt und wieder auf 80 °C erhitzt. Durch Zugabe von konzentrierter HCl bis zum Erreichen eines pH-Wertes von eins wurde das Produkt **58** ausgefällt. Nach einer Umkristallisation aus Wasser/Ethanol wurden 66 % des Spaltungsreagenzes **58** erhalten.

Der letzte Schritt in der Vorbereitung der Oligonukleotidsynthese war die Aktivierung der Taurocholsäure. Die Synthese der aktivierten Taurocholsäure **136** ging von dem an der 3-Hydroxygruppe bereits mit einem C3-Linker verlängerten und an der Sulfonsäure geschützten Vorläufer **134** aus. Dieser Baustein wurde von *Dr. Jennifer D'Onofrio* synthetisiert und zur Verfügung gestellt. Die Spaltung des Sulfonsäureethylesters

erfolgt normalerweise unter den normalen Entschützungs- und Abspaltungsbedingungen der Oligonukleotidsynthese (Ammoniak bei 50 °C).<sup>[161,162]</sup> Da diese Vorgehensweise hier aufgrund der Labilität des Safety-Catch-Linkers **111** nicht möglich war, musste die Sulfonsäure vor der Kupplung an das Oligonukleotid entschützt werden. Die Kupplung an das Oligonukleotid sollte postsynthetisch an der festen Phase erfolgen, daher ist es außerdem notwendig die Taurocholsäure **135** zu aktivieren. Eine bewährte Methode ist die Aktivierung von Hydroxygruppen als ihre entsprechenden *N*-Hydroxysuccinimidylcarbonatderivate. Diese Aktivierung kann in einem vorangehenden Schritt oder *in situ* erfolgen. In der Regel können die aktivierten Derivate ohne Probleme bei -21 °C gelagert werden. Da das Zieloligonukleotid **137** (siehe Abbildung 4-21) keine Aminoschutzgruppen und das Taurocholsäurederivat **135** keine Hydroxyschutzgruppen an den sekundären Alkoholfunktionen enthält, ist diese vorhergehende Aktivierung der *in situ* Aktivierung vorzuziehen. In Schema 4-18 ist die Herstellung des aktivierten Taurocholsäurederivats **136** dargestellt.



**Schema 4-18:** Herstellung der entschützten und *N*-Hydroxysuccinimidyl-aktivierten Taurocholsäure **136**.

Die Entschützung mit Ammoniak erfolgte zunächst bei Raumtemperatur, da nach 16 Stunden aber noch kein quantitativer Umsatz erreicht war, wurde noch zwei Stunden auf 55 °C erhitzt. Die entschützte Taurocholsäure **135** konnte dadurch mit quantitativer Ausbeute erhalten werden. Die anschließende Aktivierung mit Di-(*N*-Hydroxy-

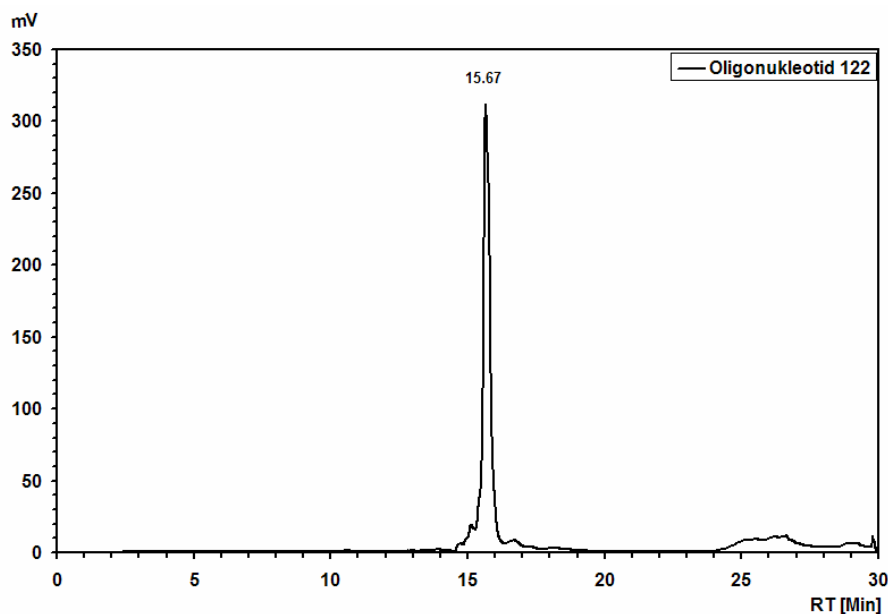
succinimidyl)carbonat (DSC) und Kaliumcarbonat als Base wurde zunächst bei 0 °C durchgeführt, um eine selektive Reaktion an der primären Hydroxygruppe des Linkers zu erreichen. Da sich aber kaum Umsatz zeigte, wurde nach 20 Stunden bei 0 °C noch weitere 20 Stunden bei Raumtemperatur gerührt. Zur Aufarbeitung wurde zunächst das Lösungsmittel entfernt und das Rohprodukt dann mit Dichlormethan im Ultraschallbad 15 Minuten lang behandelt und der unlösliche Rückstand abfiltriert. Da sich DSC nur sehr schlecht in Dichlormethan löst, wurde so der Überschuss des Reagenzes abgetrennt. Das ESI-Massenspektrum zeigte eine Mischung des monoaktivierten Produkts **136** und des Edukts **135**. Da der Taurocholsäure Ligand bei der Anbindung an das immobilisierte Oligonukleotid **137** in einem sehr großen Überschuss eingesetzt wird, wurde kein weiterer Aktivierungsversuch unternommen.

Alle benötigten Phosphoramidite und Reagenzien für die schutzgruppenfreie Oligonukleotidsynthese konnten somit erfolgreich hergestellt werden. Die Synthesen der Oligonukleotide sind im folgenden Kapitel beschrieben.

#### **4.6.2     Synthese der Oligonukleotide nach *Ohkubo et al.***

In den Arbeiten von *Ohkubo et al.* ist die Verwendung der automatisierten Festphasensynthese mit der schutzgruppenfreien Methode bereits beschrieben (siehe Kapitel 3.6.3). Das Protokoll musste allerdings an den hier verwendeten *PerSeptive Biosystems Synthesizer* angepasst werden. Neben dem Austausch des Aktivierungs- und des Oxidationsreagenzes musste ein zusätzlicher Schritt nach der Kupplung im Programm hinzugefügt werden, um die unerwünschten P-N-Bindungen zu spalten. Um die Methode und das modifizierte Programm zu testen wurde dann zunächst der unmodifizierte Strang **122** synthetisiert. Da diese Sequenz **122** keine basenlabile Modifikation enthält wurde das übliche, mit 1 µmol *N*-Acetyl-geschütztem 2'-Desoxycytidin beladene CPG-Trägermaterial verwendet. Die Abspaltung von der festen Phase erfolgte demnach hier mit Ammoniak, wobei gleichzeitig das erste Nukleotid entschützt wurde. Ansonsten wurden die schutzgruppenfreien Phosphoramidite **129**, **130** und **131** sowie 2'-Desoxythymidin-3'-phosphoramidit und LNA-Thymidin-3'-phosphoramidit verwendet. Die Oligonukleotidsynthese erfolgte nach dem modifizierten Programm für die 1 µmol DNA-Synthese (siehe Kapitel 7.10.2). Nach der ammoniakalkalischen Abspaltung über Nacht bei 40 °C wurde das rohe Oligonukleotid

**122** lyophilisiert, in 1 mL Millipore Wasser gelöst und mittels RP-HPLC gereinigt. Das RP-HPLC Chromatogramm wies nur ein Hauptsignal auf, was auf eine saubere Reaktion ohne viele Abbrüche hindeutet (Abbildung 4-20).



**Abbildung 4-20:** RP-HPLC Chromatogramm des mit der schutzgruppenfreien Synthesemethode hergestellten Testoligonukleotids **122**.

Das gereinigte Oligonukleotid wird noch mal auf *NAP<sup>TM</sup>* Säulen der Fa. GE Healthcare entsalzt und anschließend mittels ESI-Massenspektroskopie analysiert. Die Ausbeute wird durch Absorptionsmessung bei 260 nm und anschließender Berechnung der Konzentration mit Hilfe des Lambert-Beer'schen Gesetztes bestimmt. Für das Oligonukleotid **122** resultiert eine Ausbeute von 14 %.

Die Synthese des modifizierten Oligonukleotids wurde zweimal durchgeführt, da ein Strang **137** nur mit der entschützten Safety-Catch-Linkerfunktion und ein Strang **139** zusätzlich mit der aktivierten Taurocholsäure **136** modifiziert werden sollte. Das modifizierte Nukleosid **111** wird an die Sequenz des unmodifizierten Oligonukleotids **122** am 5'-Ende angehängt (Abbildung 4-21).



**Abbildung 4-21:** Sequenz der modifizierten Oligonukleotide **137** und **139**.

Nach der Synthese soll die *N*-Boc geschützte Propargylamingruppe durch manuelle Behandlung mit 3 %iger Trichloressigsäure(TCA)-Lösung in Dichlormethan entschützt werden. Eines der beiden Oligonukleotide sollte dann von der festen Phase abgespalten werden, das andere direkt mit dem aktivierten Taurocholsäurederivat **136** umgesetzt und anschließend ebenfalls von der festen Phase abgespalten werden.

Das für die Oligonukleotidsynthese verwendete Polystyrolmaterial **123** hatte eine Beladung von 11  $\mu\text{mol/g}$  und es wurden jeweils 100 mg (1.1  $\mu\text{mol}$ ) eingesetzt. Das Polystyrolmaterial **123** hatte ein zu großes Volumen für die normalerweise verwendeten Synthesizersäulen. Daher wurden aus Polystyrolhülsen und passenden Adapterfritten selbst zusammengestellte Säulen mit einem Leervolumen von ca. 500  $\mu\text{L}$  verwendet. Aufgrund des vergrößerten Volumens der Säulen wurde die Methode zur Synthese der modifizierten Oligonukleotide **137** und **139** hinsichtlich der verwendeten Volumina angepasst (siehe Kapitel 7.10.2). Nach erfolgten Oligonukleotidsynthesen wurden die festen Phasen für zehn Minuten manuell mit 3 %iger TCA-Lösung in Dichlormethan gespült, um die Boc-Schutzgruppe abzuspalten. Eines der beiden Oligonukleotide wurde dann nach gründlicher Trocknung des Trägermaterials im Vakuum erst zwei Minuten lang mit 10 %iger DBU-Lösung in Acetonitril behandelt, um die CE-Gruppe am Phosphat-Rückgrad abzuspalten. Die Abspaltung vom Träger erfolgte dann mit 0.2 M  $\text{Et}_3\text{N} \cdot 3\text{HF}$  in trockenem THF für vier Stunden bei Raumtemperatur. Nach dem Abfiltrieren der THF Lösung wird das abgespaltene Oligonukleotid mit Millipore Wasser eluiert, mittels RP-HPLC gereinigt und MALDI-Massenspektroskopie analysiert (Abbildung 4-22).

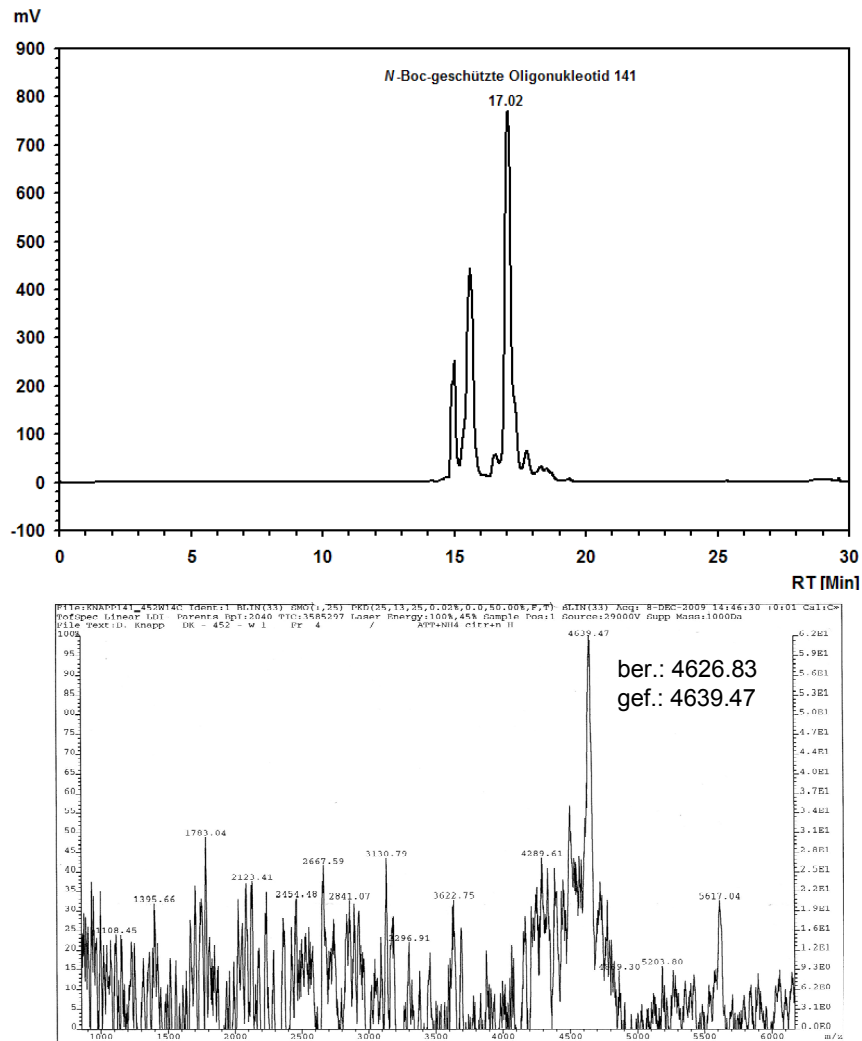


Abbildung 4-22: RP-HPLC Chromatogramm und MALDI-Massenspektrum der versuchten Synthese des Oligonukleotids **137**.

Die Analyse der isolierten Fraktionen zeigt nicht die Masse des erwarteten, entschützten Oligonukleotids **137**. Die Hauptfraktion ist das immer noch *N*-Boc-geschützte Oligonukleotid **141**, das eine Retentionszeit von 17.02 Minuten aufweist (Abbildung 4-23).

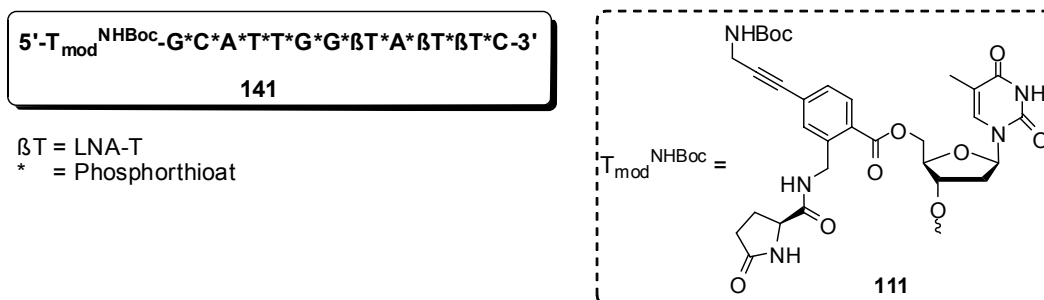


Abbildung 4-23: *N*-Boc-geschütztes Oligonukleotid **141**.

Die Massen der anderen Fraktionen im RP-HPLC Chromatogramm konnten nicht eindeutig zugeordnet werden, es handelt sich wahrscheinlich um Abbruchsequenzen. Es wurde mittels UV-Absorptionsmessung und Konzentrationsberechnung eine gute Ausbeute von 25 % des *N*-Boc-geschützten Oligonukleotids bestimmt. Der Extinktionskoeffizient des modifizierten Nukleosids **111** wurde dazu experimentell durch UV-Messungen bestimmt ( $\epsilon_{\text{Tmod}} = 18.05 \text{ cm}^2 \cdot 1000 \cdot \text{mmol}^{-1}$ ). Durch die zusätzliche aromatische Einheit wäre die Annahme des Extinktionskoeffizienten von 2'-Desoxythymidin zu ungenau gewesen.

Die hohe Stabilität der Boc-Schutzgruppe war hier sehr überraschend, da im Fall des Fluorid-spaltbaren Linkers die Entschützung der *N*-Boc-geschützten Aminogruppe zur postsynthetischen Anbindung des Farbstoffs an der festen Phase erfolgreich durchgeführt werden konnte (siehe Kapitel 5.5).<sup>[348]</sup> Außerdem wurde diese Vorgehensweise der *N*-Boc-Entschützung mit der Deblock-Lösung an CPG-gebundenen Oligonukleotiden bereits an vielen Beispielen im Arbeitskreis von *Prof. Engels* erfolgreich angewendet und veröffentlicht.<sup>[334,335]</sup> Es wurden daher noch ein weiterer Entschützungsversuch mit 10 %iger TFA in Acetonitril über zwei Stunden vorgenommen der aber auch nicht zum gewünschten Erfolg führte. Es wurde nach wie vor in der massenspektroskopischen Analyse das geschützte Oligonukleotid detektiert. Ein letzter Versuch durch 10minütige Behandlung mit wässriger TFA führte dann zu teilweise depurinierten Produkten.

Aufgrund dieser unerwartet hohen Stabilität der Boc-Schutzgruppe war es nicht möglich das ungeschützte Oligonukleotid **137** und das Taurocholsäure markierte Oligonukleotid **139** herzustellen. Daher konnten die geplanten Zelltests bisher noch nicht durchgeführt werden. Die erhaltenen Ergebnisse sind trotzdem sehr positiv, da die schutzgruppenfreie Oligonukleotidsynthese mit dem Linker **111** erfolgreich durchgeführt werden und das Oligonukleotid **141** mit einer guten Ausbeute von 25 % erhalten werden konnte. Durch den Wechsel der Schutzgruppe zu der labileren Monomethoxytritylgruppe (MMTr) sollte die Herstellung der geplanten Oligonukleotide **137** und **139** möglich sein. Dann könnten auch die geplanten Antisense-Experimente in Hep3B-Zellen durchgeführt und die Eigenschaften des Linkers zur Verbesserung der Zellaufnahme bzw. in weiterführenden Tests zur Verbesserung der Verweildauer untersucht werden.





# 5 Reversible Terminatoren zur DNA-Sequenzierung

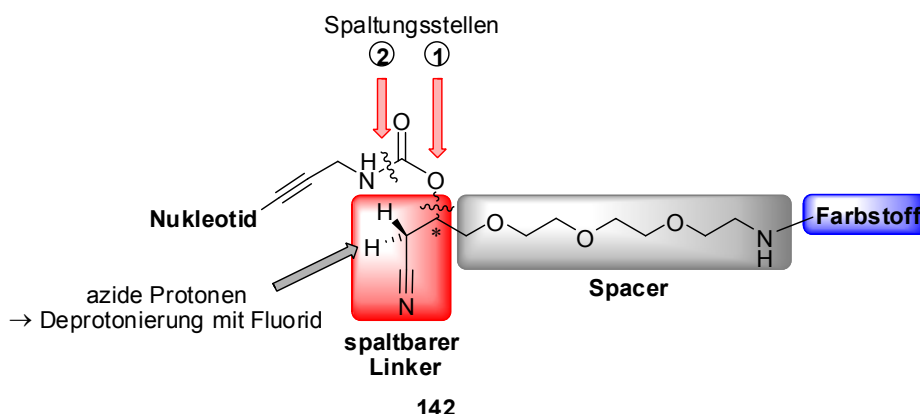
Das zweite Ziel dieser Arbeit war die Entwicklung eines Fluorid-spaltbaren Linkers zur reversiblen Farbstoffmarkierung von Nukleotiden für die Herstellung von reversiblen Terminatoren. Im Rahmen des EU-Projekts „ArraySBS“ (siehe Kapitel 3.5) sollten diese reversiblen Terminatoren in einem *Sequenzierung durch Synthese*-Ansatz eingesetzt werden. Wie in Kapitel 3.5 bereits beschrieben stellte sich im Rahmen des Screenings verschiedener 3'-blockierender Gruppen die 2-Cyanoethyl(CE)gruppe als am geeignetsten heraus.<sup>[298,349,350]</sup> Da diese Gruppe mit Fluorid spaltbar ist, ist für die Synthese effektiver reversibler Terminatoren auch ein Fluorid-spaltbarer Linker für die Anbindung des Farbstoffs notwendig. Im folgenden Kapitel sollen zunächst das Design und der Synthesepfad des Fluorid-spaltbaren Linkers diskutiert werden.

## 5.1 Design und Synthesestrategie des Fluorid-spaltbaren Linkers

Die strukturellen Anforderungen an den Linker sind:

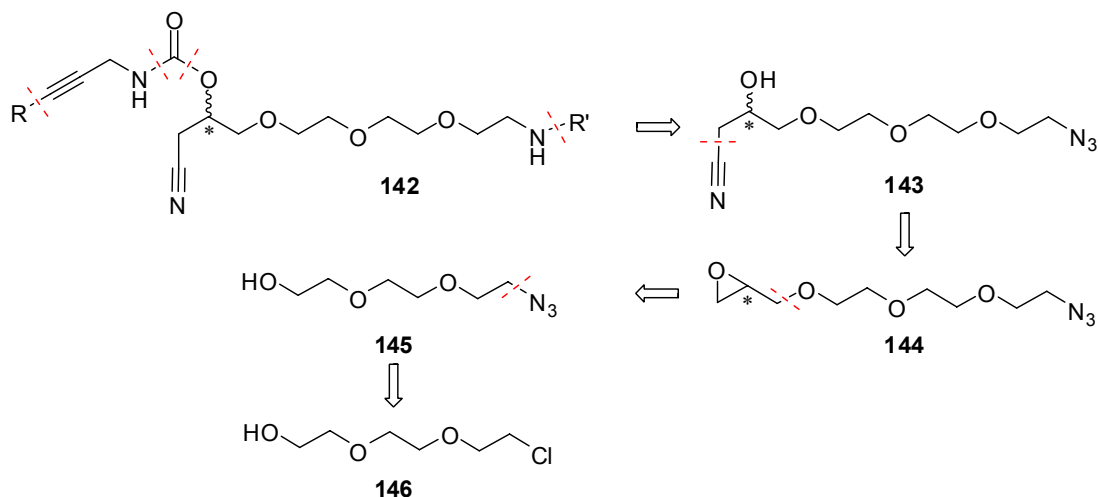
- 1) eine Fluorid-spaltbare Einheit
- 2) einen Anknüpfungspunkt für das Nukleotid
- 3) einen Anknüpfungspunkt für den Fluoreszenzfarbstoff
- 4) eine Spacereinheit, die den sterisch anspruchsvollen Farbstoff räumlich von dem Nukleotid, an dem die Polymerasereaktion stattfindet, separiert

In Abbildung 5-1 ist die Struktur des entworfenen Linkers **142** abgebildet, die alle Anforderungen zur Synthese eines reversiblen Terminators erfüllt.



**Abbildung 5-1:** Struktur des Fluorid-spaltbaren Linkers **142**.

Die Anbindung des Nukleotids soll über einen Propargylaminspacer an die Carbamateinheit an der sekundären Hydroxygruppe erfolgen. Die Carbamatfunktion bietet den Vorteil, dass bei der Spaltung Kohlendioxid freigesetzt wird, was die Spaltungsgeschwindigkeit stark erhöhen sollte. Der Propargylaminspacer ist notwendig, da die Anbindung des Reportermoleküls und damit des Linkers an der Baseneinheit des Nukleotids erfolgen muss (vergleiche Kapitel 3.4.4). Das ist unter Verwendung der 5- bzw. 7-Iododerivate der Nukleoside mittels einer Sonogashira Kupplung geplant. Die Fluorid-spaltbare Einheit (rot) wurde basierend auf der Struktur der CE-Gruppe entworfen. Es sollen dabei ebenfalls die aziden Protonen (grauer Pfeil) in Nachbarschaft zu der Nitrilgruppe ausgenutzt werden. Entsprechend den postulierten Mechanismen für Fluorid-spaltbare Schutzgruppen, die auf diesem Prinzip beruhen,<sup>[297,298,350-352]</sup> sollte die Spaltung des Linkers **142** nach einem  $\beta$ -Eliminierungsmechanismus verlaufen. Fluoridanionen wirken dabei als Base. Durch die  $\beta$ -Eliminierung wird zunächst die Bindung zu der sekundären Hydroxygruppe gespalten (Spaltungsstelle ①) und anschließend unter Freisetzung von Kohlendioxid die Bindung zum Nukleotid (Spaltungsstelle ②). Der Fluoreszenzfarbstoff (blau) soll über eine Aminogruppe angebunden werden, die durch eine Triethylenglykoleinheit als Spacer von der Spaltungsstelle und dem Nukleotid getrennt ist. Die Synthesestrategie für den Linker **142** ist in Schema 5-1 retrosynthetisch dargestellt.



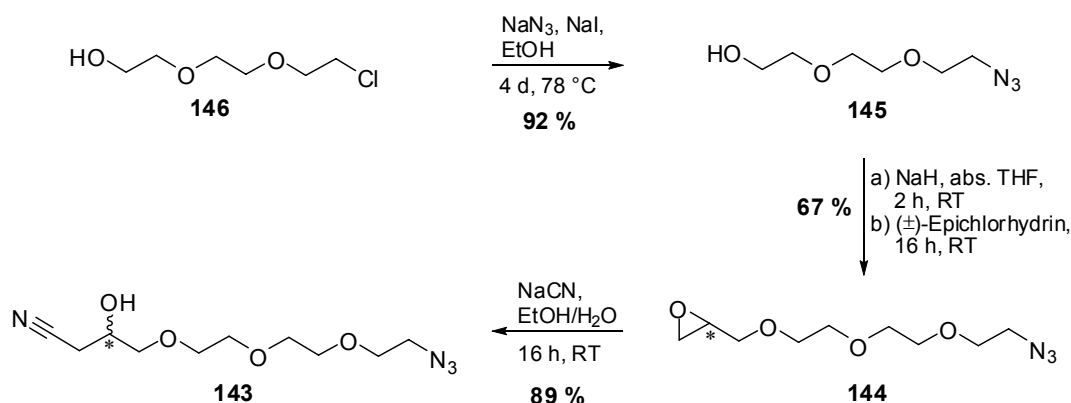
**Schema 5-1:** Retrosynthese des Fluorid-spaltbaren Linkers **142**.

Die letzten Schritte sollten der Aufbau der Carbamatgruppe, die Einführung des zu markierenden Nukleotids (R) und des Fluoreszenzfarbstoffs (R') sein. Die Verbindung **143** ist also die Kernstruktur des Linkers, bei der die Funktionalität zur Anbindung des Reporters als Azid vorliegt. Diese Grundstruktur **143** sollte in drei Schritten aus einfachen und kostengünstigen Vorläufern aufgebaut werden. Die Einführung der Nitrilgruppe sollte dabei durch Öffnung des Epoxidvorläufers **144** mit Natriumcyanid erreicht werden. Durch Alkylierung des Triethylenglykol Monoazids **145** mit Epichlorhydrin sollte der Epoxidvorläufer **144** erhalten werden. Die Einführung der Azidgruppe war durch eine nukleophile Substitution mit Natriumazid an dem kommerziell erhältlichen Triethylenglykol Monochlorid **146** geplant.

Im folgenden Kapitel wird nun die Synthese des Grundbausteins **143** sowie einer Modellverbindung **147** beschrieben.

## 5.2 Synthese der Kernstruktur **143** des Fluorid-spaltbaren Linkers und der Modellverbindung **147**

Die Synthese des Bausteins **143** konnte wie geplant (siehe Schema 5-1) in drei Stufen mit guten bis sehr guten Ausbeuten aus kostengünstigen Startmaterialien hergestellt werden (Schema 5-2).

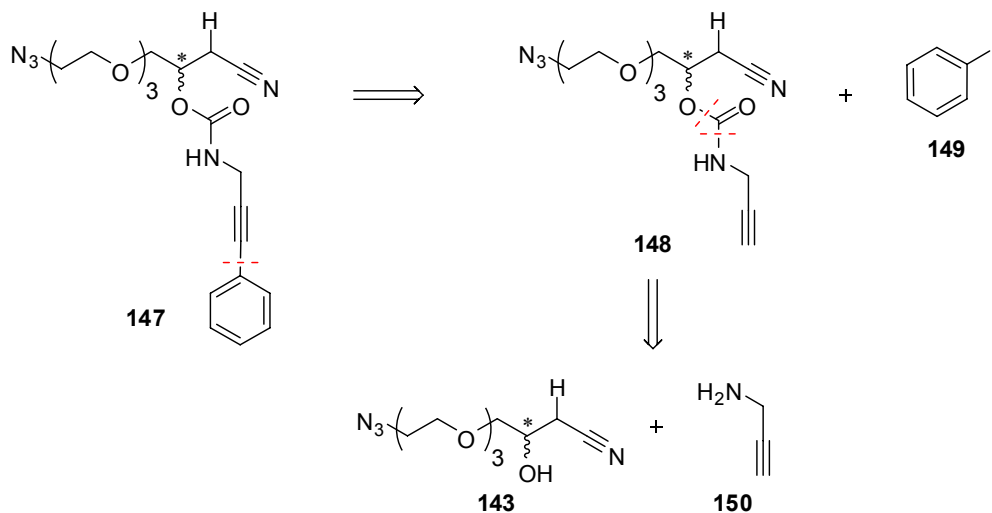


**Schema 5-2:** Synthese der Grundstruktur **143** des Fluorid-spaltbaren Linkers.

Ausgehend von dem kommerziell erhältlichen Triethylenglykol Monochlorid **146** wurde die Azidfunktion durch eine nukleophile Substitution mit Natriumazid und einer Ausbeute von 92 % eingeführt. Dabei konnte die Ausbeute im Vergleich zur Literatur (62 %<sup>[353]</sup>) um 30 % gesteigert werden. Der nächste Schritt war eine weitere nukleophile Substitution der deprotonierten primären Hydroxygruppe an racemischem (±)-Epichlorhydrin. Hierzu wurde der Alkohol **145** zunächst mit Natriumhydrid bei Raumtemperatur deprotoniert. Anschließend wurde das (±)-Epichlorhydrin zugetropft und die Reaktion noch 16 Stunden bei Raumtemperatur gerührt. Die neue Verbindung **144** wurde mit einer Ausbeute von 67 % erhalten. Das Epoxid wurde schließlich mit einer sehr guten Ausbeute von 89 % durch Natriumcyanid geöffnet, um die Fluorid-spaltbare Einheit des Linkers aufzubauen. Die neue Verbindung **143** wurde mit einer sehr guten Gesamtausbeute von 58 % über drei Stufen erhalten.

Durch die Verwendung von (±)-Epichlorhydrin wurde der Linker **143** als racemisches Gemisch erhalten. In den weiteren Synthesen entstanden daraus diastereomere Folgeprodukte. Es konnten aber keine Nachteile aufgrund unterschiedlicher chemischer oder physikalischer Eigenschaften der Diastereomere festgestellt werden.

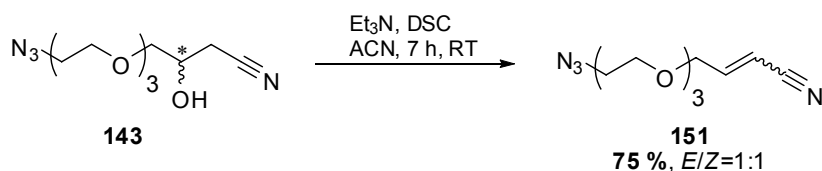
Nach der erfolgreichen Synthese der Kernstruktur **143** des entwickelten Linkers wurde eine Modellverbindung hergestellt, mit der zum einen der Aufbau der Carbamateinheit getestet und zum anderen die Spaltungseigenschaften und der Spaltungsmechanismus untersucht werden sollten. Hierzu wurde eine geeignete Modellverbindung **147** entworfen, deren retrosynthetische Analyse in Schema 5-3 gezeigt ist.



**Schema 5-3:** Retrosynthese der Modellverbindung **147**.

Als Modells substrat soll ein Phenylrest verwendet werden. Die geplante Synthese sah eine Sonogashira Kupplung des kompletten Propargylaminocarbamat-modifizierten Linkers **148** an Iodbenzol **149** vor. Der modifizierte Linker **148** sollte durch Aktivierung der Kernstruktur **143** mit einem aktivierten Carbonat (z. B. DSC) und anschließender Umsetzung mit Propargylamin **150** hergestellt werden.

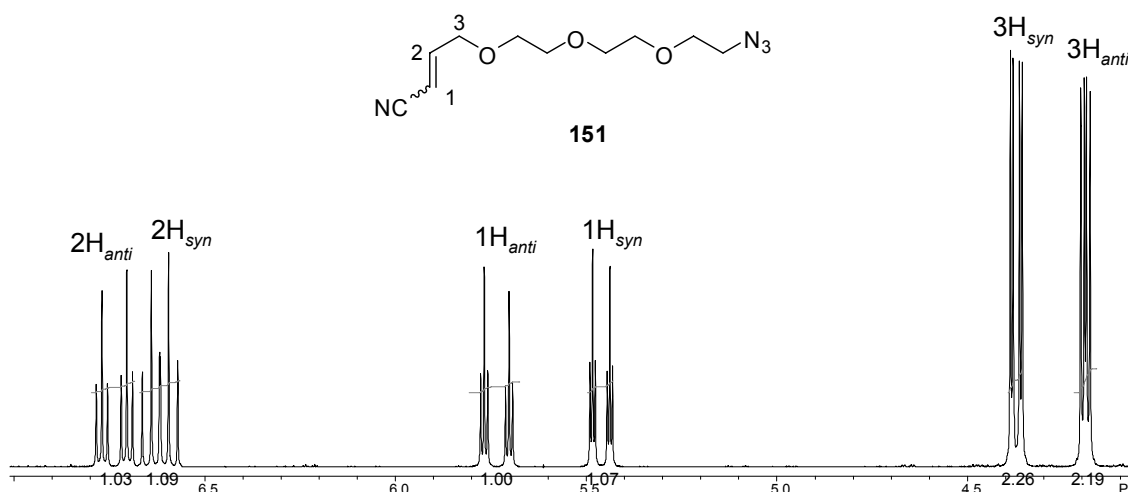
Der erste Versuch der Aktivierung von **143** wurde in Anlehnung an eine Literaturvorschrift zur Aktivierung einer Hydroxygruppe mit DSC bei Raumtemperatur und mit Triethylamin als Base durchgeführt (Schema 5-4).<sup>[354]</sup>



**Schema 5-4:** Versuchte Herstellung des *N*-Hydrosuccinimidylcarbonat aktivierten Linkers mit Triethylamin als Base.

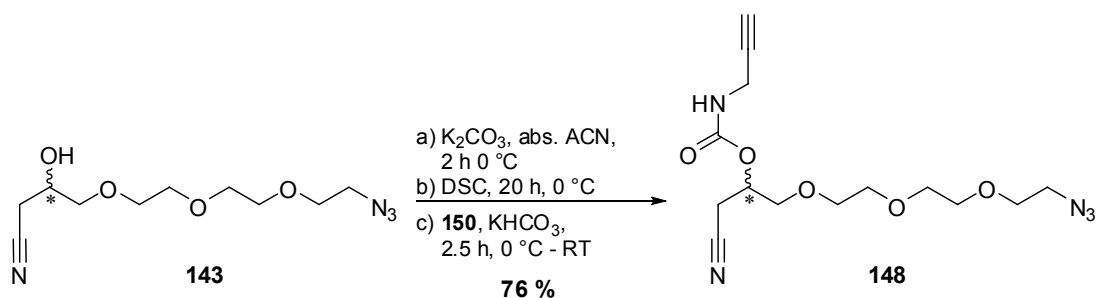
Es wurde dabei allerdings nicht das gewünschte, aktivierte Intermediat erhalten, sondern das Eliminierungsprodukt **151**. Dieses konnte mit einer Ausbeute von 75 %

isoliert werden. Das Isomerenverhältnis (*E*-Isomer zu *Z*-Isomer) betrug 1:1 und wurde aus dem  $^1\text{H}$ -NMR Spektrum bestimmt (Abbildung 5-2).



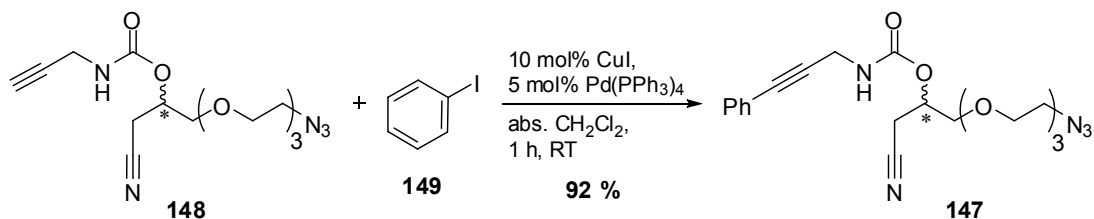
**Abbildung 5-2:** Ausschnitt aus dem  $^1\text{H}$ -NMR Spektrum von Verbindung **151**.

Dieses Ergebnis weist bereits auf eine  $\beta$ -Eliminierung als Spaltungsmechanismus hin, da Verbindung **151** eines der erwarteten Spaltungsprodukte ist (siehe Schema 5-7). Um die Modellverbindung **147** herstellen zu können musste eine modifizierte Methode zur Aktivierung von Verbindung **143** entwickelt werden. Dies gelang durch die Verwendung von wasserfreiem Kaliumcarbonat als heterogene Base und eine genaue Kontrolle der Temperatur. In einer Eintopfreaktion konnte so direkt der komplette Linker **148** hergestellt werden (Schema 5-5).



**Schema 5-5:** Herstellung des kompletten, Propargylaminocarbamat-modifizierten Linkers **148**.

Der Linker **143** wurde *in situ* mit DSC aktiviert und direkt im Anschluss mit Propargylamin **150** zu dem Propargylaminocarbamat-modifizierten Linker **148** weiter umgesetzt. Der neue, Fluorid-spaltbare Linker **148** konnte so mit einer guten Ausbeute von 76 % erhalten werden. Die Modellverbindung **147** wurde dann wie in Schema 5-6 beschrieben synthetisiert.

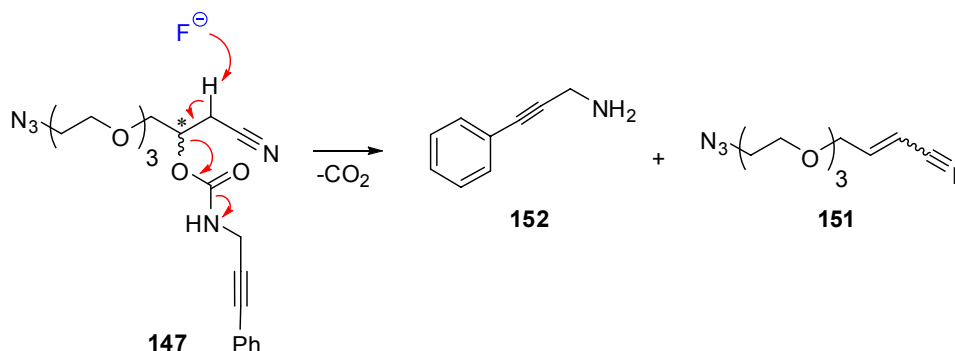


**Schema 5-6:** Synthese der Modellverbindung **147**.

Die Sonogashira Kupplung des kompletten Linkers **148** an Iodbenzol **149** verlief mit einer sehr guten Ausbeute von 92 %. Es wurde keine kupferkatalysierte [2+3]-Cycloaddition („Click“-Reaktion) als Nebenreaktion zwischen der Azidfunktion und der Dreifachbindung beobachtet. Die Modellverbindung **147** wurde ausgehend von dem Linker **143** mit einer Gesamtausbeute von 70 % über zwei Stufen erhalten. Außerdem konnten im Rahmen ihrer Synthese die Bedingungen zur Aktivierung der sekundären Hydroxygruppe mit DSC optimiert werden. Die Modellverbindung **147** wurde dann zur Untersuchung der Spaltungseigenschaften und des Spaltungsmechanismus des Fluoridspaltbaren Linkers eingesetzt. Die durchgeführten Experimente sind im folgenden Kapitel beschrieben.

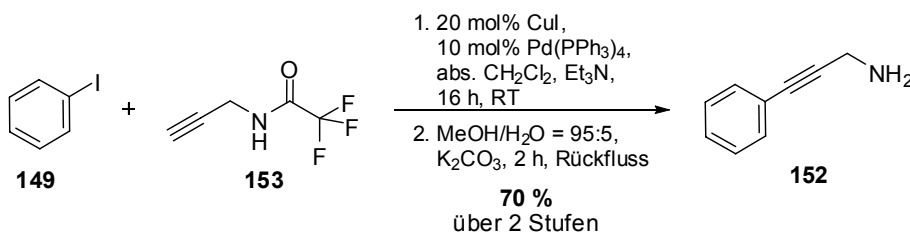
### 5.3 Spaltungseigenschaften und Spaltungsmechanismus der Modellverbindung **147**

Zur Untersuchung der Spaltungseigenschaften und des Spaltungsmechanismus des Fluorid-spaltbaren Linkers wurden Experimente unter verschiedenen Bedingungen im kleinen Maßstab (ca. 30 mg des Edukts **147**) durchgeführt und mittels RP-HPLC analysiert. In Schema 5-7 sind zunächst der erwartete Spaltungsmechanismus und die Produkte gezeigt.



**Schema 5-7:** Erwarteter Spaltungsmechanismus der Modellverbindung **147**.

Der Spaltungsmechanismus sollte einem  $\beta$ -Eliminierungsmechanismus folgen, wie es auch für die zuvor genannten, Fluorid-spaltbaren Schutzgruppen vorgeschlagen wird. Durch die Wahl des Phenylrests als Modells substrat konnten das Edukt **147** und das Spaltungsprodukt **152** leicht mittels UV-detektierter RP-HPLC identifiziert und quantifiziert werden. Das Olefin **151** war mit der verwendeten Methode nicht detektierbar. Das Produkt **152** wurde als Referenz für die RP-HPLC Analyse synthetisiert (Schema 5-8).



**Schema 5-8:** Synthese des erwarteten Produkts **152** als Referenz für die RP-HPLC Analyse.

In der Literatur ist die Sonogashira Kupplung des freien Propargylamins **150** an Iodobenzol **149** bekannt.<sup>[355]</sup> Da diese Reaktion aber nur eine Ausbeute von 45 % liefert, wurde das Trifluoracetat(TFA)-geschützte Propargylamin **153** verwendet. Die



Sonogashira Kupplung an Iodbenzol **149** verlief mit einer Ausbeute von 97 %. Die anschließende Entschützung des Kupplungsprodukts mit methanolischem Kaliumcarbonat unter Rückfluss lieferte das gewünschte Produkt **152** mit einer Gesamtausbeute von 70 % über zwei Stufen.

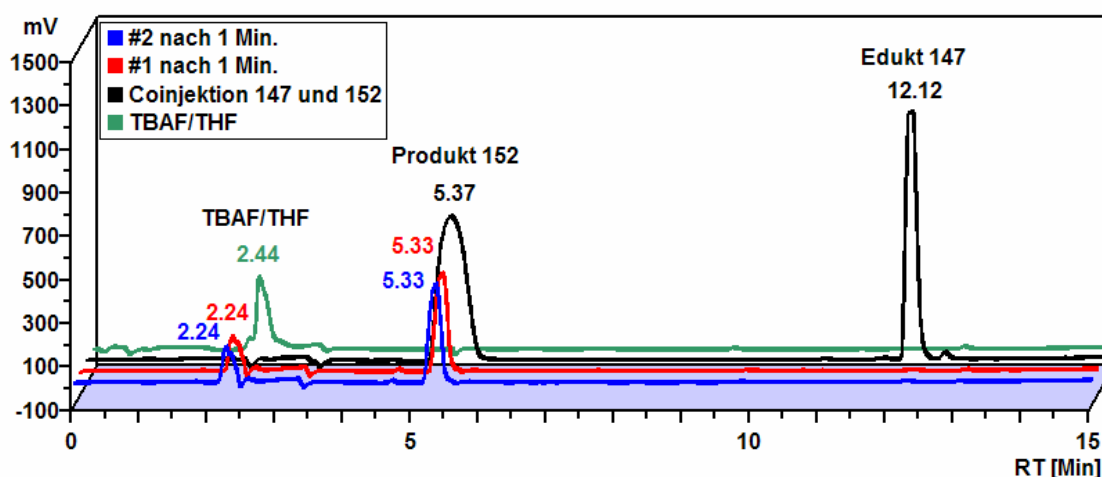
In Tabelle 5-1 sind die Spaltungsexperimente mit der Modellverbindung **147** zusammengefasst.

**Tabelle 5-1:** Spaltungsexperimente mit der Modellverbindung **147**.

#	Reagenz (Äq.)	Lösungsmittel	T	Spaltung <sup>[a]</sup>	t
1	1 M TBAF (50)	abs. THF	60 °C	quant.	< 1 Min.
2	1 M TBAF (50)	abs. THF	RT	quant.	< 1 Min.
3	1 M TBAF (5)	abs. THF	RT	quant.	10 Min.
4	28 % aq. NH <sub>3</sub> (100)	MeOH	RT	60 %	18 h
5	Et <sub>3</sub> N·3HF (5)	abs. THF	RT	0	20 h
6	aq. TFA (40)	MeOH	RT	0	48 h

<sup>[a]</sup>Die Reaktionen wurden mittels analytischer RP-HPLC verfolgt.

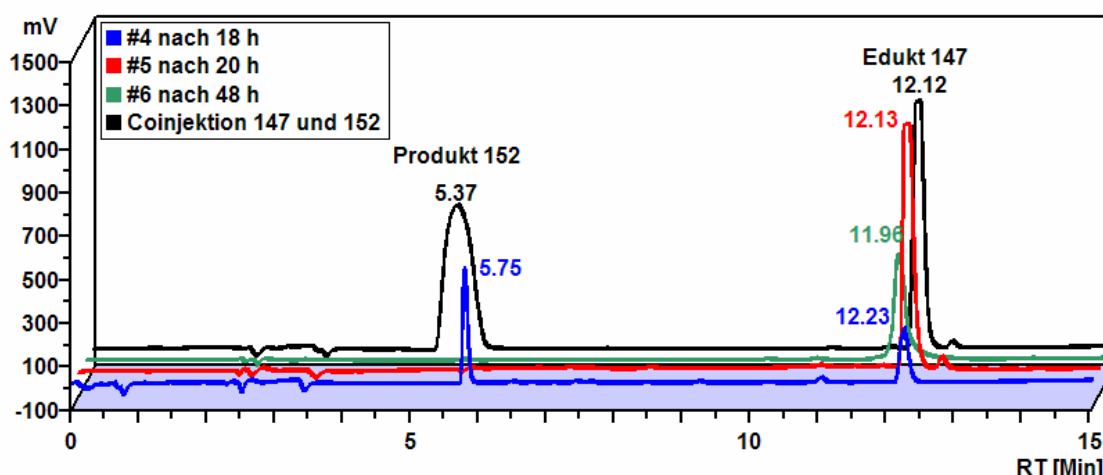
Hinsichtlich der Anwendung des Fluorid-spaltbaren Linkers zur Synthese von Fluoreszenz-markierten, reversiblen Terminatoren für die DNA-Sequenzierung wurden in Eintrag #1 die optimierten Bedingungen für die Spaltung der 3'-terminierenden CE-Gruppe getestet.<sup>[298,350]</sup> Das erste Spaltungsexperiment wurde daher bei 60 °C durchgeführt. Es wurde außerdem mit einem sehr großen Überschuss an Fluorid gearbeitet, um die Bedingungen an den immobilisierten Oligonukleotiden zu imitieren. Der Versuch #2 wurde außer bei Raumtemperatur unter den gleichen Bedingungen wie #1 durchgeführt. In Abbildung 5-3 sind die RP-HPLC Chromatogramme der Einträge #1 und #2 sowie die Referenzchromatogramme des Edukts **147**, des Produkts **152** und der 1 M TBAF-Lösung gezeigt.



**Abbildung 5-3:** RP-HPLC Chromatogramm der Spaltungsexperimente #1 und #2 sowie des Edukts **147**, des Spaltungsprodukts **152** und der 1 M TBAF Lösung in THF.

Unter den Bedingungen in #1 (60 °C) wurde die Modellverbindung **147** in weniger als einer Minute quantitativ gespalten. Der Versuch wurde dann bei Raumtemperatur wiederholt (#2), um mehr über die Geschwindigkeit der Spaltung aussagen zu können. Allerdings wurde auch bei Raumtemperatur eine Spaltung in weniger als einer Minute beobachtet. Im Gegensatz zu der reversibel terminierenden 3'-Modifikation ist also im Fall des Linkers keine erhöhte Temperatur notwendig, um eine sehr effektive Spaltung zu erreichen. Um die Spaltungsreaktion zu verlangsamen wurde der Überschuss an TBAF auf ein Zehntel verringert (#3 in Tabelle 5-1). Die Spaltung war dennoch sehr effektiv und nach zehn Minuten vollständig. Im Vergleich dazu benötigt die 3'-O-CE-Gruppe unter den zu #1 analogen Bedingungen sechs Minuten bis zur vollständigen Spaltung.<sup>[298,350]</sup> Eine plausible Erklärung für die drastische Beschleunigung im Fall der Modellverbindung **147** ist die Freisetzung von Kohlendioxid während des Zerfalls.

Es wurden weitere Spaltungsexperimente mit anderen Reagenzien durchgeführt. So wurde erwartet, dass die Modellverbindung **147** auch mit anderen Basen spaltbar ist, sollte der Mechanismus auf einer  $\beta$ -Eliminierung beruhen. In Abbildung 5-4 sind die RP-HPLC Chromatogramme der Experiment #4, #5 und #6 aus Tabelle 5-1 abgebildet.



**Abbildung 5-4:** RP-HPLC Chromatogramm der Spaltungsexperimente #4, #5 und #6 aus Tabelle 5-1 sowie des Edukts **147** und des Spaltungsprodukts **152**.

Für die Spaltung mit einem sehr großen Überschuss an konzentriertem Ammoniak (#4, blau) zeigte sich ein deutlicher Unterschied in der Effektivität zwischen Fluorid und Ammoniak. Die Spaltung war in Ammoniak bei Raumtemperatur nach 18 Stunden lediglich zu 60 % fortgeschritten. Experiment #5 (rot) zeigte hingegen, dass die Modellverbindung **147** stabil gegen das leicht saure Fluoridreagenz  $\text{Et}_3\text{N}\cdot 3\text{HF}$  ist und #6 (grün), dass der Linker auch nach 48 Stunden in stark saurer Umgebung vollständig stabil ist. Die Stabilität in saurer Umgebung ist von großer Bedeutung, da sie die Möglichkeit der Verwendung säurelabiler Schutzgruppen zusammen mit dem Fluorid-spaltbaren Linker eröffnet.

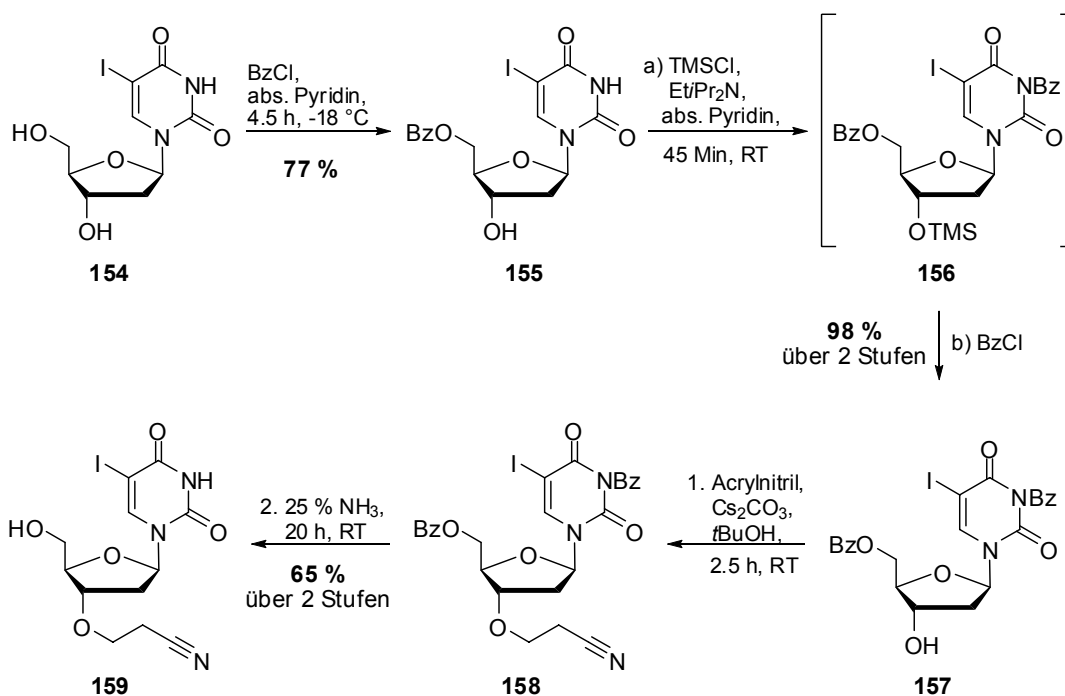
Insgesamt gab die RP-HPLC Analytik einen weiteren Hinweis auf den  $\beta$ -Eliminierungsmechanismus, da das erwartete Spaltungsprodukt **152** detektiert wurde. Ein weiteres Indiz war die Stabilität des Linkers gegen  $\text{Et}_3\text{N}\cdot 3\text{HF}$ . Die Spaltung fand nur mit einem basischen Fluoridreagenz statt. Zur endgültigen Klärung des Mechanismus wurde nach den Spaltungsexperimenten mit RP-HPLC Analytik ein Experiment im größeren Maßstab durchgeführt. Die beiden Spaltungsprodukte **152** und **151** wurden dabei mit quantitativer Ausbeute isoliert. Das *E/Z*-Isomerenverhältnis in Verbindung **151** betrug hier ebenfalls 1:1 und wurde aus dem  $^1\text{H}$ -NMR Spektrum bestimmt.

Mit Hilfe der Modellverbindung **147** und den damit durchgeführten Spaltungsexperimenten konnte gezeigt werden, dass der entwickelte Linker

außerordentlich schnell mit 1 M TBAF in THF gespalten wird und die Spaltung außerdem nach dem erwarteten  $\beta$ -Eliminierungsmechanismus erfolgt. Außerdem wurde gezeigt, dass der Linker unter sauren Bedingungen stabil ist, was für die Synthese der reversiblen Terminatoren von großer Bedeutung ist.

## 5.4 Synthese und Spaltungseigenschaften eines modifizierten Nukleosids

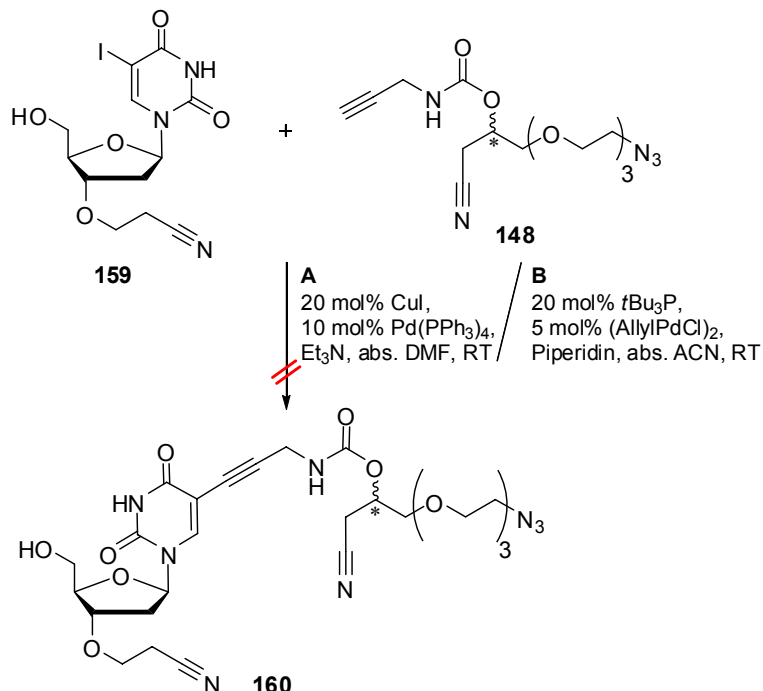
Nach den erfolgreichen Experimenten mit der Modellverbindung **147** wurde ein modifiziertes Nukleosid synthetisiert, um die Synthese und Spaltungseigenschaften mit dem eigentlichen, nukleosidischen Substrat zu analysieren. Das Nukleosid wurde auch an der 3'-Position mit der CE-Gruppe modifiziert, um die unterschiedlichen Spaltungsgeschwindigkeiten des Linkers und der 3'-blockierenden Gruppe in einem Molekül untersuchen zu können. In Schema 5-9 ist zunächst die Einführung der 3'-Modifikation gezeigt, die entsprechend der von *Dr. Angelika Keller* entwickelten Synthesestrategie durchgeführt wurde.<sup>[298]</sup>



**Schema 5-9:** Einführung der CE-Gruppe als 3'-Modifikation in 5-Iodo-2'-desoxyuridin **154**.

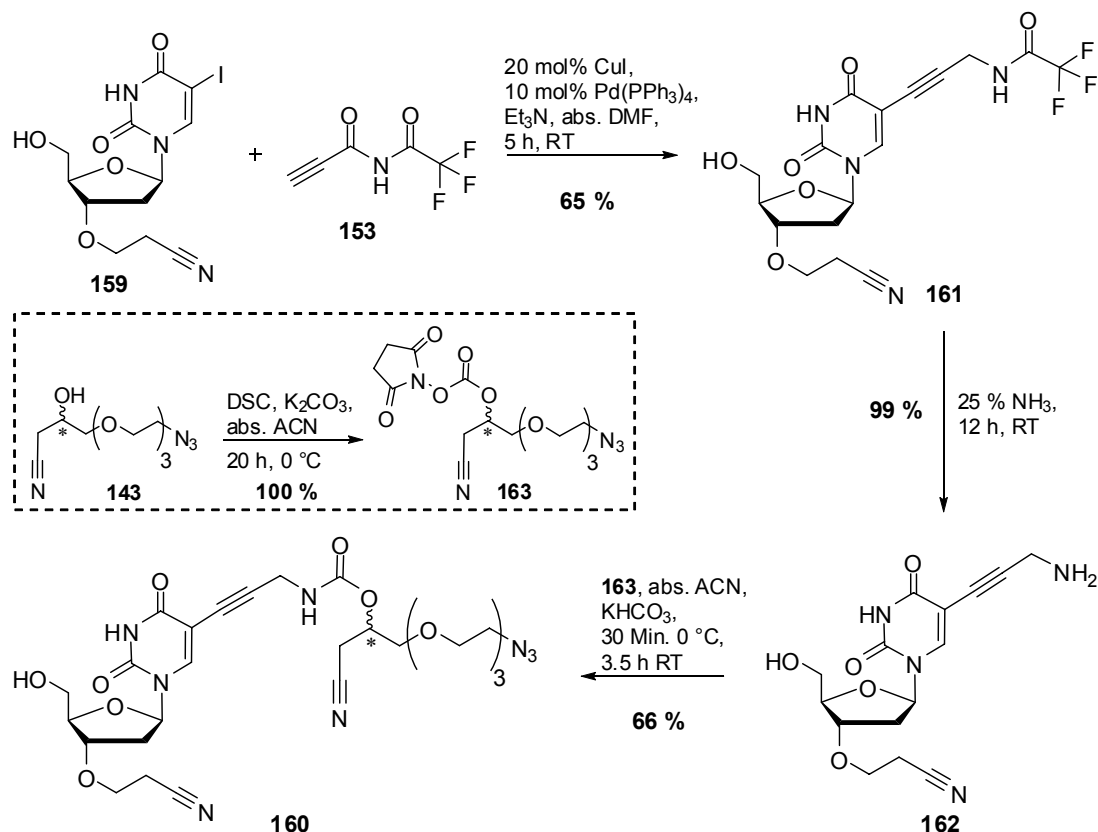
Das 3'-O-CE-modifizierte Nukleosid **159** konnte mit einer um 30 % verbesserten Ausbeute von 49 % (Literatur 19 %<sup>[298]</sup>) über fünf Stufen erhalten werden. Der anspruchsvollste Schritt ist hier die Michael-Addition von Acrylnitril an die 3'-Position. Es ist notwendig frisch destilliertes Acrylnitril zu verwenden. Des Weiteren darf die Reaktion nicht zu verdünnt durchgeführt werden und es ist auf eine sehr starke Durchmischung des Reaktionsgemisches zu achten. Das geschützte, 3'-O-modifizierte Nukleosid **158** wurde nicht aufgereinigt, sondern direkt zur Entschützung eingesetzt.

Daher ist hier die Ausbeute über zwei Stufen angegeben. Mit dem geschützten Nukleosid **159** wurde dann versucht den kompletten Linker **148** mittels einer Sonogashira Kupplung einzuführen (Schema 5-10).



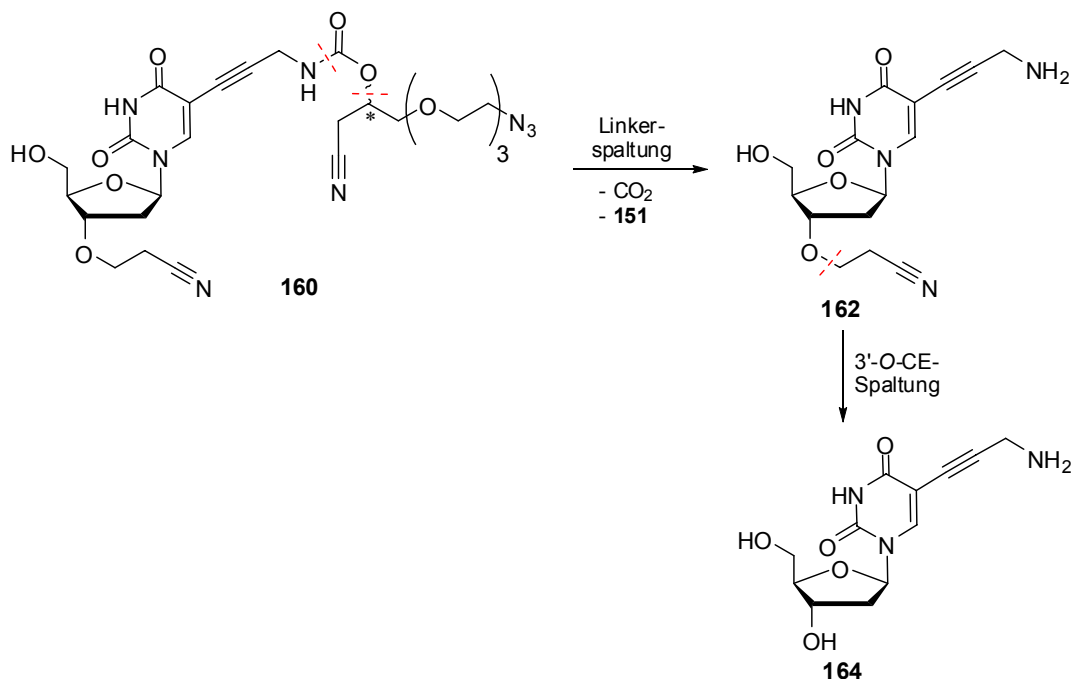
**Schema 5-10:** Versuchte Sonogashira Kupplung des Linkers **148** an das 3'-modifizierte Nukleosid **159**.

Die Kupplung des Linkers **148** an das Nukleosid **159** unter den Standardbedingungen (**A**) der Sonogashira Kupplung war nicht erfolgreich, da die kupferkatalysierte „Click“-Reaktion hier schneller ablief als die gewünschte Reaktion. Der Grund dafür ist die wesentlich geringere Reaktivität der aromatische Nukleobase **159** im Vergleich zu Iodobenzol **149**. Es wurde auch eine kupferfreie Variante (**B**) der Sonogashira Kupplung getestet, die für weniger reaktive Bromaromaten entwickelt wurde.<sup>[356]</sup> Allerdings konnte in diesem Fall ebenfalls kein gewünschtes Produkt isoliert werden. Die Synthesestrategie wurde daher geändert und das Zielmolekül **160** in drei Stufen synthetisiert. Zunächst wurde die Sonogashira Kupplung mit TFA-geschütztem Propargylamin **153** durchgeführt und nach Entschützung der Aminogruppe der *N*-Hydroxy-succinimidylcarbonat aktivierte Linker **163** angebunden (Schema 5-11).



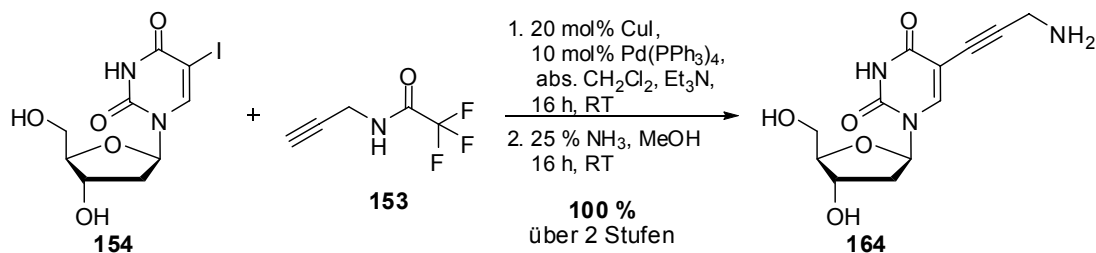
**Schema 5-11:** Synthese des modifizierten Nukleosids **160**.

Die Sonogashira Kupplung des *N*-TFA-geschützten Alkins **153** an das 3'-*O*-CE-modifizierte Nukleosid **159** gelang entsprechend der Literaturvorschrift<sup>[298]</sup> mit einer Ausbeute von 65 %. Nach der quantitativen Entschützung mit Ammoniak wurde das 3'-*O*-CE-5-Propargylamin-modifizierte Nukleosid **162** mit dem aktivierten Linker **163** in trockenem Acetonitril und Kaliumhydrogencarbonat als Base umgesetzt. Die Aktivierung des Linkers **143** erfolgte wie in der Eintopfreaktion zum kompletten Linker **148** beschrieben (siehe Schema 5-5) durch Umsetzung mit DSC und wasserfreiem K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> bei 0 °C. Der aktivierte Linker **163** wurde isoliert und ohne weitere Aufreinigung verwendet. Das modifizierte Nukleosid konnte mit einer Gesamtausbeute von 42 % ausgehend von dem 3'-*O*-CE-modifizierten Nukleosid **159** über drei Stufen erhalten werden und wurde dann in Spaltungsexperimenten eingesetzt. Aus den bisherigen Ergebnissen für die Spaltung der 3'-*O*-CE-Gruppe<sup>[298,350]</sup> und des Linkers (siehe Kapitel 5.3) war eine zweistufige Spaltung zu erwarten. Es sollte zuerst der Linker und anschließend die 3'-*O*-CE-Gruppe gespalten werden. In Schema 5-12 ist der erwartete Spaltungsmechanismus gezeigt.



**Schema 5-12:** Erwarteter, zweistufiger Spaltungsmechanismus des modifizierten Nukleosids **160**.

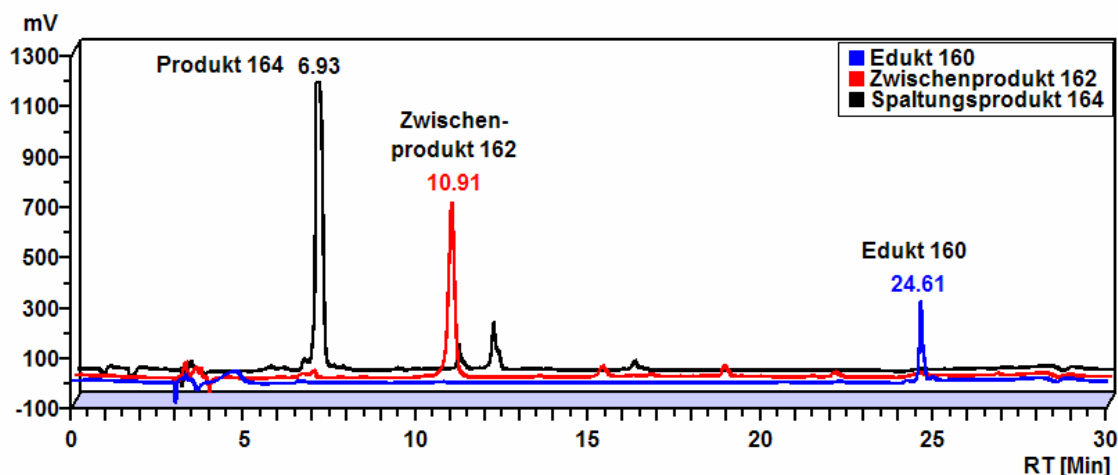
Das erwartete Zwischenprodukt **162** war aus der Synthese des modifizierten Nukleosids **160** bereits bekannt und daher als Referenz für die RP-HPLC Analytik verfügbar. Das erwartete Endprodukt **164** musste zuvor synthetisiert werden. Die Synthese ist in Schema 5-13 gezeigt.



**Schema 5-13:** Synthese des erwarteten Endprodukts **164** der Spaltungsversuche mit dem Nukleosid **160**.

Die Sonogashira Kupplung wurde wie in der Literatur beschrieben, nur mit erhöhter Katalysatormenge, durchgeführt.<sup>[357]</sup> Dabei konnte die Ausbeute der Sonogashira Kupplung von 77 % auf 100 % verbessert werden. Die anschließende Entschützung erfolgte mit konzentriertem Ammoniak und das gewünschte Produkt **164** konnte mit einer quantitativen Ausbeute über zwei Stufen erhalten werden. Die Chromatogramme des Edukts **160**, des Zwischenprodukts **162** und des kompletten Spaltungsprodukts **164** sind in Abbildung 5-5 gezeigt.





**Abbildung 5-5:** RP-HPLC Chromatogramme des Edukts **160**, des Zwischenprodukts **162** und des kompletten Spaltungsprodukts **164**.

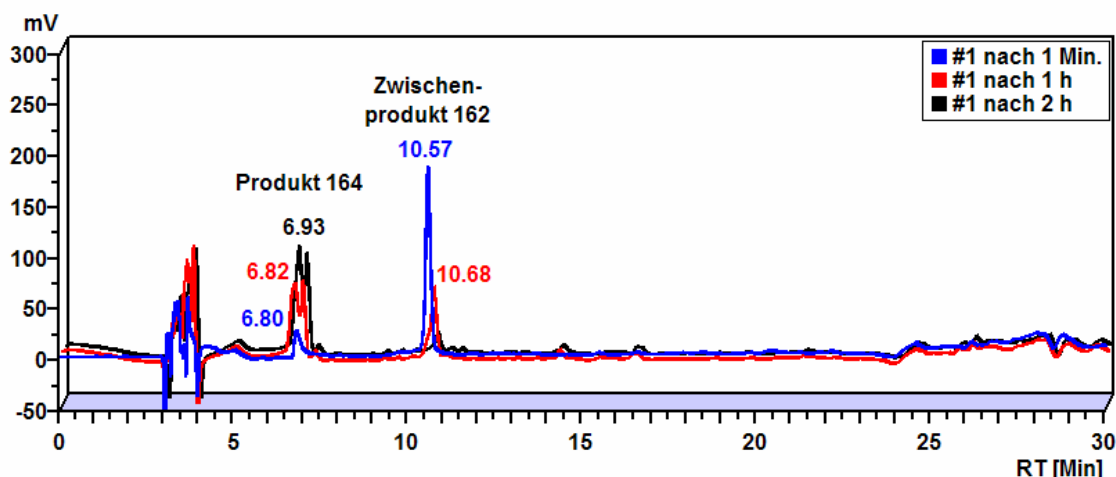
Die verschiedenen Verbindungen sind mit der verwendeten RP-HPLC Methode durch ihre unterschiedlichen Retentionszeiten gut zu unterscheiden. Der Nachweis des Zwischenprodukts **162** und damit des vermuteten zweistufigen Spaltungsmechanismus sollte daher einfach möglich sein. In Tabelle 5-2 sind die durchgeführten Spaltungsexperimente mit Verbindung **160** zusammengefasst.

**Tabelle 5-2:** Spaltungsexperimente mit dem modifizierten Nukleosid **160**.

#	Reagenz (Äq.)	Lösungsmittel	T	Linker		3'-O-CE	
				Spaltung <sup>[a]</sup>	t	Spaltung <sup>[a]</sup>	t
1	1 M TBAF (55)	abs. THF	RT	quant.	< 1 Min.	quant.	2 h
2	25 % aq. NH <sub>3</sub> (450)	-	RT	quant.	2 h	0 %	2 h

<sup>[a]</sup>Die Reaktionen wurden mittels analytischer RP-HPLC verfolgt.

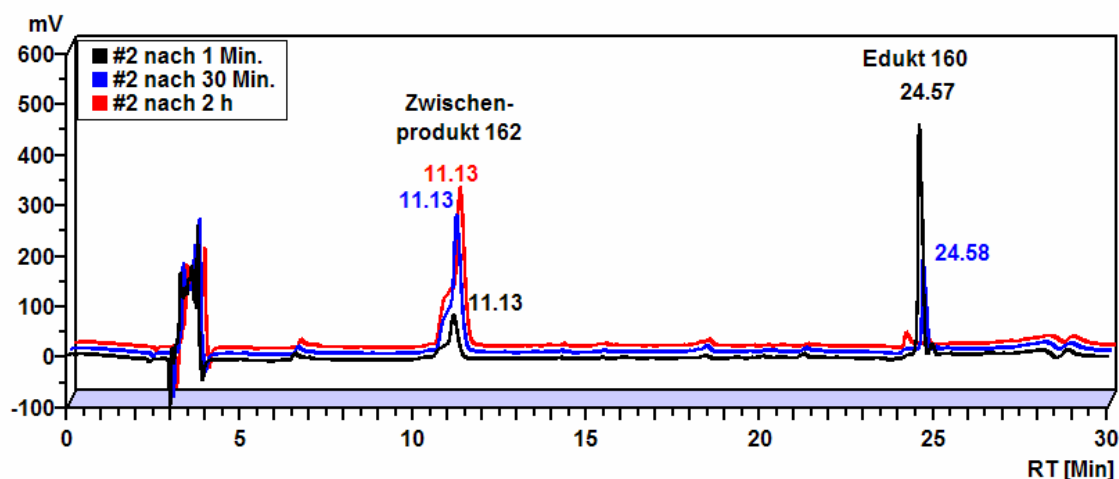
Es wurden zwei Spaltungsexperimente mit dem modifizierten Nukleosid **160** durchgeführt. Für das Experiment #1 wurden analoge Bedingungen wie bei Experiment #2 in Tabelle 5-1 für die Modellverbindung **147** gewählt. In Abbildung 5-6 sind die RP-HPLC Chromatogramme zu verschiedenen Zeitpunkten der Spaltung mit 1 M TBAF gezeigt.



**Abbildung 5-6:** RP-HPLC Chromatogramme von #1 in Tabelle 5-2 zu verschiedenen Zeitpunkten der Reaktion.

In blau ist die Analyse der Reaktionsmischung nach einer Minute gezeigt, es ist kein Edukt mehr zu sehen, die Hauptkomponente ist das Zwischenprodukt **162**. In rot ist die Analyse nach einer Stunde gezeigt, die eine deutliche aber nicht vollständige Umsetzung des Zwischenprodukts **162** zum Spaltungsprodukt **164** aufweist. Nach zwei Stunden (schwarz) ist das Zwischenprodukt **162** vollständig zu dem Produkt **164** umgesetzt. Es konnte mit diesem Spaltungsexperiment also gezeigt werden, dass die Spaltung des modifizierten Nukleosids **160** unter den gewählten Bedingungen, entsprechend den Spaltungseigenschaften der Modellverbindung **147**, in weniger als einer Minute verläuft. Wie erwartet wurde außerdem ein zweistufiger Mechanismus beobachtet. Dabei wird der Linker ca. 200mal schneller gespalten, als die 3'-O-CE-Gruppe.

Ein zweites Spaltungsexperiment wurde mit konzentriertem Ammoniak durchgeführt (#2 in Tabelle 5-2). Die Bedingungen waren hier nicht analog den Bedingungen des entsprechenden Spaltungsexperiments mit der Modellverbindung **147** (siehe #4 in Tabelle 5-1). Es wurde hier mehr als das vierfache der Äquivalente an Ammoniak und kein zusätzliches Lösungsmittel verwendet, um eine vollständige Spaltung des Linkers zu erreichen. Dabei wird eine Spaltung zu dem Zwischenprodukt **162** erwartet, da die 3'-O-CE-Gruppe in konzentriertem Ammoniak stabil ist.<sup>[298]</sup> In Abbildung 5-7 sind die RP-HPLC Chromatogramme des Experiments #2 aus Tabelle 5-2 zu verschiedenen Zeitpunkten der Reaktion gezeigt.



**Abbildung 5-7:** RP-HPLC Chromatogramme von #2 in Tabelle 5-2 zu verschiedenen Zeitpunkten der Reaktion.

Die RP-HPLC Analyse zeigt die vollständige Umsetzung des Edukts **160** nach zwei Stunden zu dem Zwischenprodukt **162** und bestätigt die Stabilität der 3'-O-CE-Gruppe. Im Gegensatz dazu war die Modellverbindung **147** mit 100 Äquivalenten Ammoniak und Methanol als Cosolvenz nach 16 Stunden nur zu 60 % gespalten. Die Labilität des Linkers gegen Ammoniak hängt also stark von den gewählten Bedingungen ab. Die Spaltung mit Ammoniak ist trotzdem wesentlich langsamer (ca. 200mal), als die Spaltung mit TBAF.

Mit den gezeigten Experimenten konnte nachgewiesen werden, dass der Linker bei Raumtemperatur ca. 200mal schneller durch TBAF gespalten wird als die 3'-O-CE-Gruppe. Des Weiteren zeigen die Versuche, dass kein Unterschied in der Effektivität der Linkerspaltung zwischen der Modellverbindung **147** und dem eigentlich geplanten, nukleosidischen Substrat besteht. Da der Linker in reversiblen Terminatoren für einen *Sequenzierung durch Synthese*-Ansatz eingesetzt werden soll, wurden die Spaltungsbedingungen an einem modifizierten Oligonukleotid untersucht. Die Ergebnisse werden im folgenden Kapitel beschrieben.

## 5.5      **Synthese und Spaltung eines Fluorescein-markierten 8mer Oligonukleotids**

Für die weitere Evaluierung der Spaltungsbedingungen des Linkers und der 3'-O-CE-Modifikation unter möglichst anwendungsnahen Bedingungen wurde ein Spaltungsexperiment an einem 8mer Oligonukleotid durchgeführt. Dazu sollte ein modifiziertes Nukleosid am 3'-Ende eingeführt werden, das den Fluorid-spaltbaren Linker und die 3'-O-CE-Gruppe trägt. Da es sich bei dem modifizierten Nukleosid um einen 3'-blockierten Baustein handelte, war es notwendig die Oligonukleotidsynthese in die inverse Richtung durchzuführen. Das heißt, die automatisierte Synthese verlief nicht wie üblich von 3' in Richtung 5', sondern von 5' in Richtung 3'. Das erforderte zum einen CPG(*controlled pore glass*)-Material, das über die 5'-Hydroxygruppe an das erste Nukleosid geknüpft ist und zum zweiten die entsprechenden 5'-Phosphoramidite zum Aufbau des Oligonukleotids. Die benötigte feste Phase und die Amidite sind kommerziell erhältlich, so dass dadurch kein zusätzlicher synthetischer Aufwand entstand.

Zur Imitierung der Bedingungen immobilisierter Template in einem *Sequenzierung durch Synthese*-Experiment, sollte das Oligonukleotid direkt nach der Synthese an der festen Phase (CPG) mit TBAF entschützt werden. Dazu sollte es aber zunächst am Linker mit Fluorescein markiert werden, um die Detektion des Spaltungsprodukts des Linkers zu ermöglichen. Die Fluoresceinmarkierung war postsynthetisch am immobilisierten Oligonukleotid geplant. Um die Anbindung des Farbstoffs über den kommerziell erhältlichen *N*-Hydroxysuccinimidylester zu ermöglichen musste am Linker die Azidgruppe zuvor zur Aminogruppe reduziert werden. Die schnellste Methode hierzu wäre die Reduktion auf der Stufe des bereits hergestellten modifizierten Nukleosids **160** durchzuführen. Da bei einer hydrogenolytischen Reduktion Nebenreaktionen durch die Reduktion der beiden Nitrilgruppen befürchtet wurden, sollte die Staudinger Reduktion angewendet werden. Aus den Spaltungs- und Stabilitätsexperimenten mit der Modellverbindung **147** und dem Nukleosid **160** war aber bereits bekannt, dass die Hydrolyse des Phosphazens, aufgrund der Spaltbarkeit des Linkers, nicht mit konzentriertem Ammoniak durchgeführt werden kann. Es wurden daher einige saure

Hydrolysebedingungen mit unterschiedlichen Phosphanreagenzien getestet (Tabelle 5-3).

**Tabelle 5-3:** Reduktionsversuche der Modellverbindung **147** unter Staudinger Bedingungen ohne konzentrierten Ammoniak.

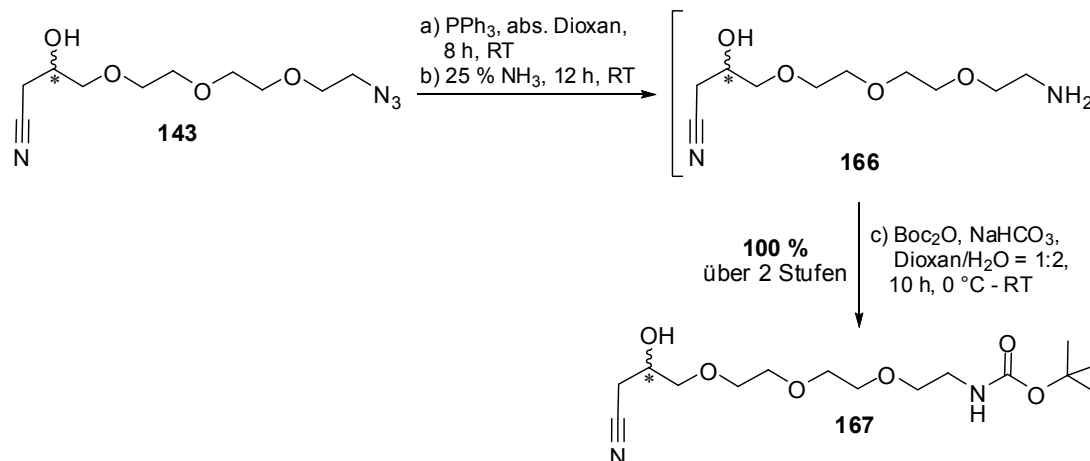
Reaction scheme: **147** (azido-linker)  $\xrightarrow[\text{abs. Pyridin, RT}]{\text{Reagenzien, } t^1, t^2}$  **165** (amino-derivative)

#	Reagenzien	pH-Wert	t <sup>1</sup> [h] <sup>[a]</sup>	t <sup>2</sup> [h] <sup>[b]</sup>	Ausbeute
1	Ph <sub>3</sub> P, TFA-Lsg.	5	16	20	Spuren <sup>[c]</sup>
2	nBu <sub>3</sub> P, TFA-Lsg.	5	16	20	0 %
3	(4-Fluorophenyl) <sub>3</sub> P, TFA-Lsg.	3	2	48	57 %

<sup>[a]</sup>t<sup>1</sup> = Reaktionszeit mit dem Phosphanreagenz, <sup>[b]</sup>t<sup>2</sup> = Reaktionszeit der Hydrolyse. <sup>[c]</sup>Das Reduktionsprodukt **165** wurde zusammen mit weiteren Nebenprodukten in der RP-HPLC und massenspektroskopischen Analyse detektiert.

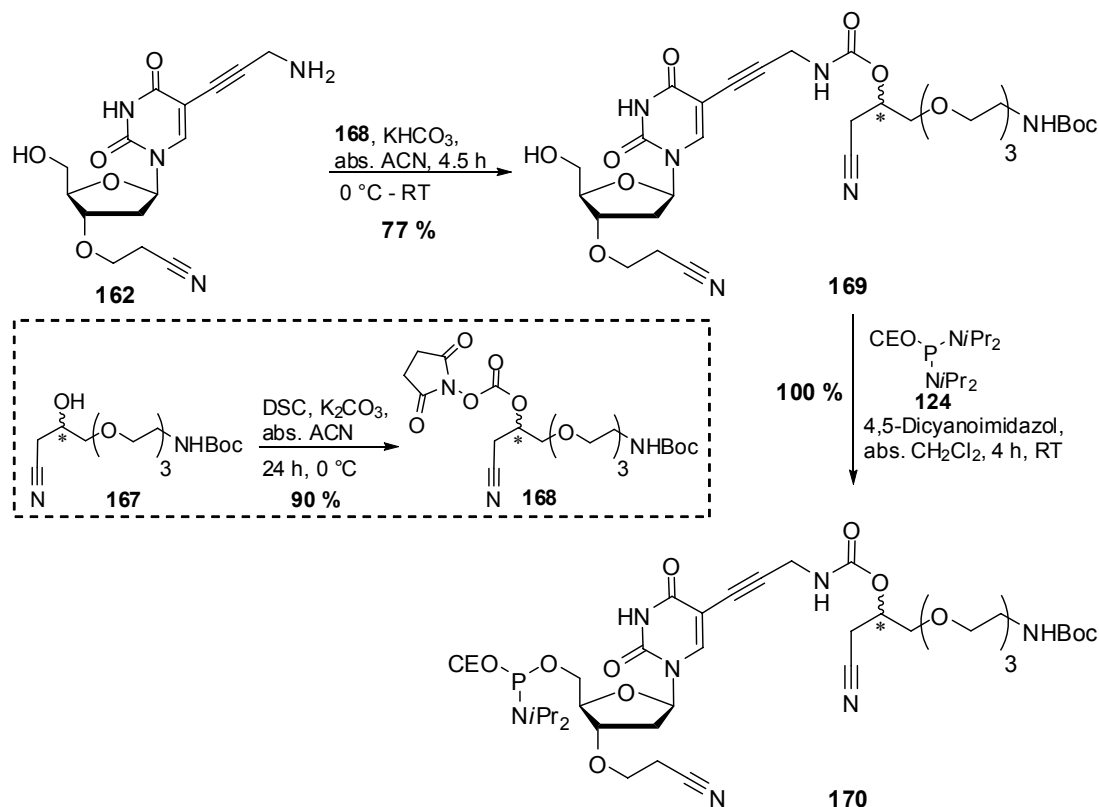
In Experiment #1 wurde ein erster Testansatz mit Triphenylphosphan und leicht saurer (pH = 5) TFA-Lösung durchgeführt. Die Analyse des Rohprodukts mittels RP-HPLC und ESI-Massenspektroskopie zeigte neben Spuren des gewünschten Produkts noch mehrere unbekannte Nebenprodukte. In Experiment #2 wurde dann anstatt Triphenylphosphan Tributylphosphan bei gleich bleibendem pH-Wert verwendet. Bei Verwendung dieses Phosphanreagenzes konnte kein gewünschtes Produkt in der RP-HPLC bzw. massenspektroskopischen Analyse des Rohprodukts gefunden werden. Eine erfolgreiche Umsetzung des Azido-Linkers **147** zum reduzierten Aminoderivat **165** konnte mit Tri(4-fluorophenyl)phosphan und einer saureren Hydrolyse bei pH = 3 (#3) erreicht werden. Es wurde dabei eine Ausbeute von 57 % erzielt, was in Anbetracht der starken Abweichungen von den Standardbedingungen prinzipiell zufriedenstellend ist. Problematisch war diese Vorschrift bzw. die Ausbeute allerdings hinsichtlich der späten Stufe auf der sie angewendet werden sollte. Die Synthese des in Kapitel 5.4 beschriebene 2'-Desoxythymidinderivats **160** verläuft über acht Stufen, lässt man die Synthese und Aktivierung des Linkers unberücksichtigt. Für die anderen Nukleoside sind es aufgrund aufwendigerer Schutzgruppenstrategien noch mehr Stufen. Für die spätere Synthese der reversiblen Terminatoren wäre diese Reduktion sogar erst auf der Stufe des Triphosphats wünschenswert gewesen. Es war also aufgrund dieser Tatsachen vorteilhafter die Synthesestrategie dahingehend anzupassen, dass der Linker **143** bereits

vor dem Aufbau der Carbamateinheit und Anbindung an das Nukleosid reduziert und die freie Aminogruppe geschützt wurde. Die Synthese des reduzierten und *N*-Boc geschützten Linkers **167** ist in Schema 5-14 gezeigt.



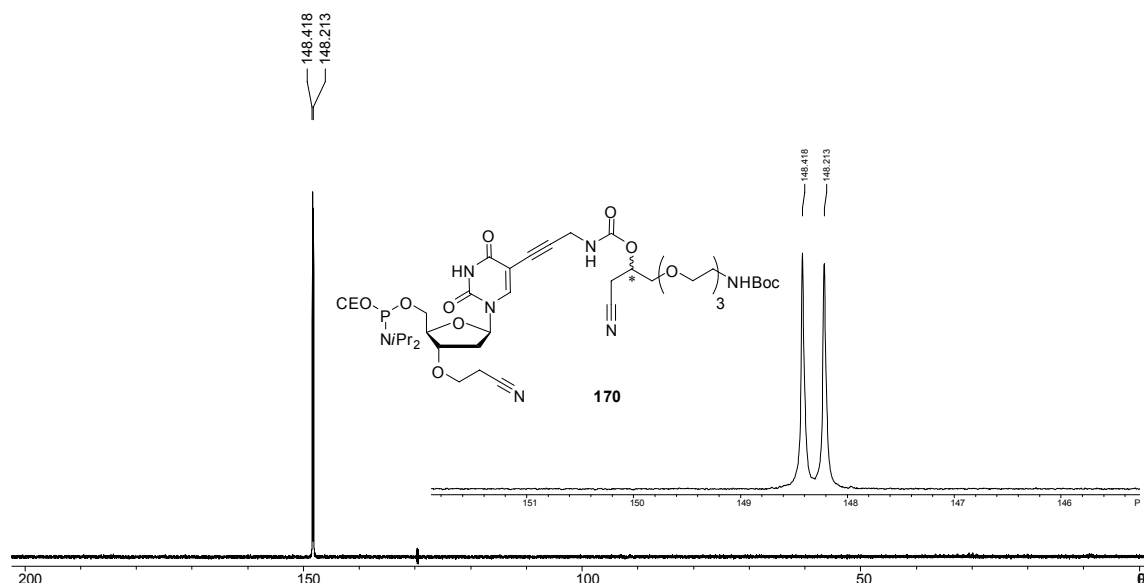
**Schema 5-14:** Synthese des reduzierten und *N*-Boc geschützten Linkers **167**.

Die Reduktion und Schützung der Aminogruppe wurde in einer Art Eintopfprozedur durchgeführt. Dabei wurde zunächst der Staudinger Reduktionsschritt nach Standardbedingungen mit Triphenylphosphan und konzentriertem Ammoniak durchgeführt. Nach Entfernung des Lösungsmittels im Vakuum wurde das freie Amin durch dreimalige Extraktion mit 25 mL 1 M HCl aus der organischen in die wässrige Phase isoliert. Diese wurde dann mit festem NaHCO<sub>3</sub> neutralisiert und bei 0 °C mit 40 mL Dioxan, weiteren 1.5 Äquivalenten NaHCO<sub>3</sub> und Di-*tert*-butyldicarbonat (Boc<sub>2</sub>O) versetzt. Nach weiteren zehn Stunden Rühren bei Raumtemperatur konnte der reduzierte, *N*-Boc-geschützte Linker **167** in quantitativer Ausbeute erhalten werden. Analog der Synthese des Azido-Linker-modifizierten Nukleosids **160** wurde auch das mit dem Linker **167** modifizierte Nukleosid **169** hergestellt und dann weiter zu dem, für die Oligonukleotidsynthese benötigten, 5'-Phosphoramidit umgesetzt (Schema 5-15).



**Schema 5-15:** Synthese des mit dem reduzierten Linker modifizierten Nukleosids **169** und des entsprechenden 5'-Phosphoramidits **170**.

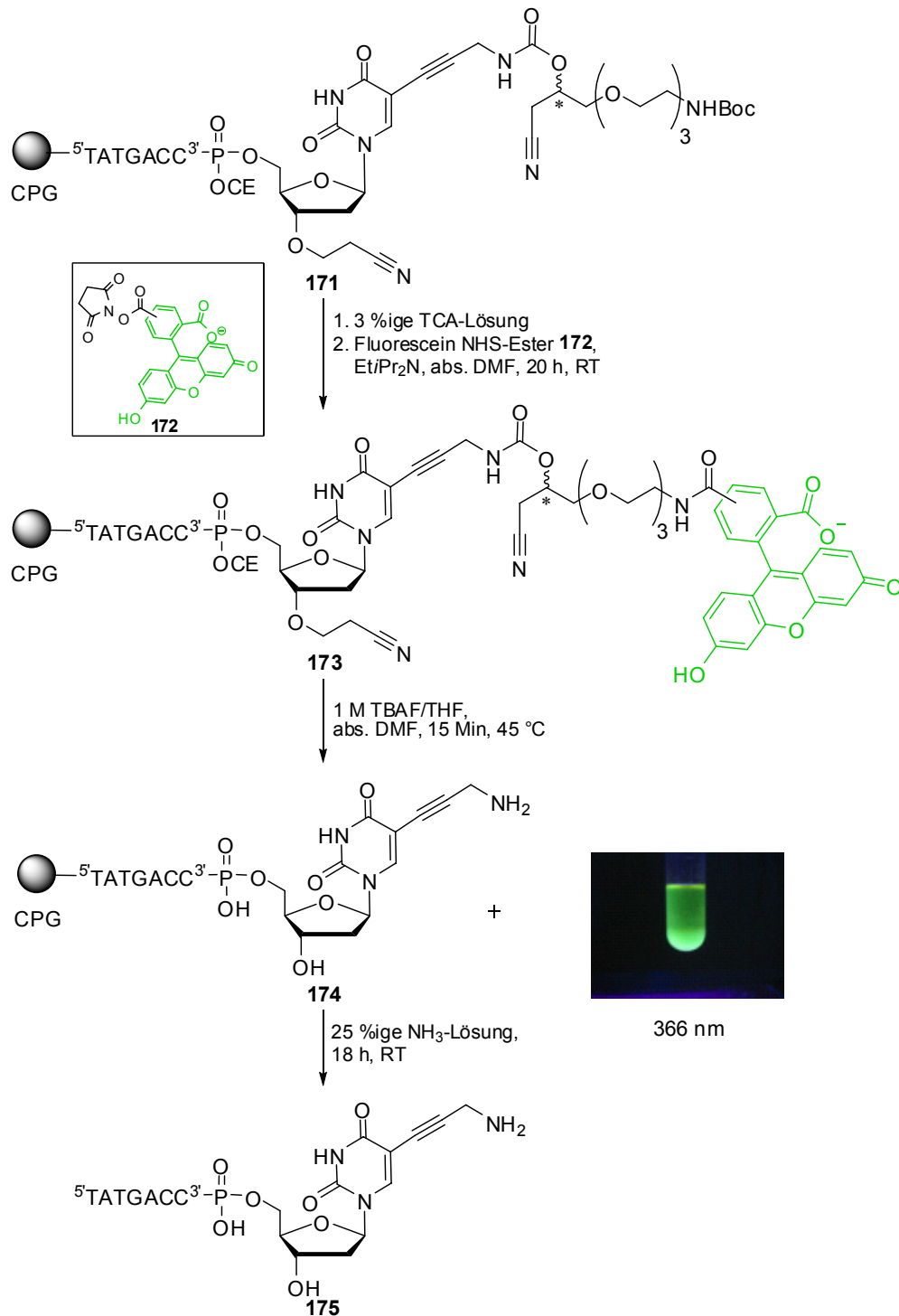
Der Linker **167** wurde entsprechend der Vorschrift für den Azido-Linker **143** mit DSC aktiviert und mit dem 5-Propargylamino-3'-*O*-CE-2'-desoxyuridinderivat **162** zu dem modifizierten Nukleosid **169** umgesetzt. Das Nukleosid **169** wurde mit einer guten Ausbeute von 77 % erhalten. Die weitere Umsetzung zum 5'-Phosphoramidit **170** erfolgte mit *N,N,N,N*-Tetraisopropyl-*O*-cyanoethyl-phosphoramidit **124** als Phosphorylierer und 4,5-Dicyanoimidazol als Base. Das Phosphoramidit **170** wurde mit quantitativer Ausbeute und, wie aus dem in Abbildung 5-8 gezeigten <sup>31</sup>P-NMR Spektrum zu sehen ist, sehr hoher Reinheit erhalten.



**Abbildung 5-8:**  $^{31}\text{P}$ -NMR Spektrum des Phosphoramidits **170**.

Das  $^{31}\text{P}$ -NMR Spektrum zeigt, dass nur eine phosphorhaltige Verbindung enthalten war. Als Modelloligonukleotid wurde das 8mer 5'-TATGACCT<sub>mod</sub>-3' **171** gewählt, wobei T<sub>mod</sub> für den modifizierten Baustein **170** steht. Es wurde unter Verwendung der Phosphoramiditmethode<sup>[9-11]</sup> an einem *PerSeptive Biosystems Synthesizer* synthetisiert. In Schema 5-16 sind die der Synthese folgenden Schritte zur Farbstoffmarkierung, TBAF-Entschützung und Abspaltung von der festen Phase gezeigt.

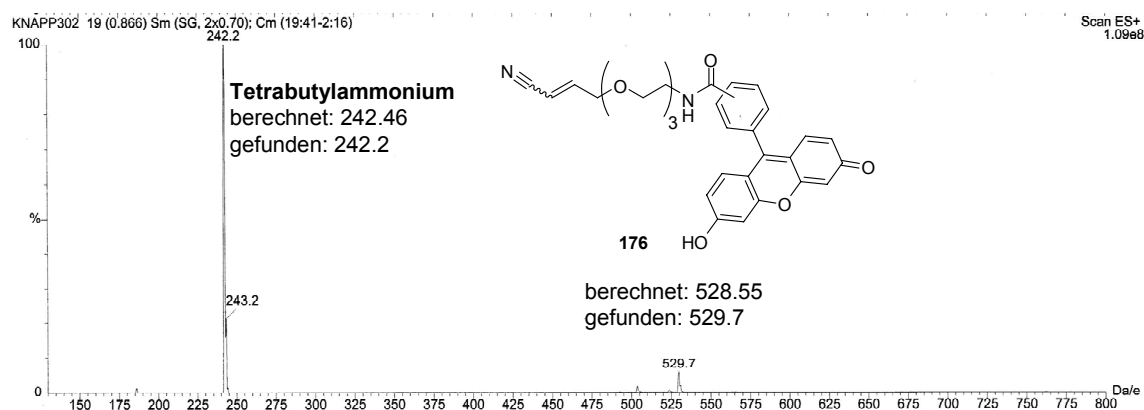




**Schema 5-16:** Farbstoffmarkierung, TBAF-Entschützung und Abspaltung des Oligonukleotids **171** von der festen Phase (CPG).

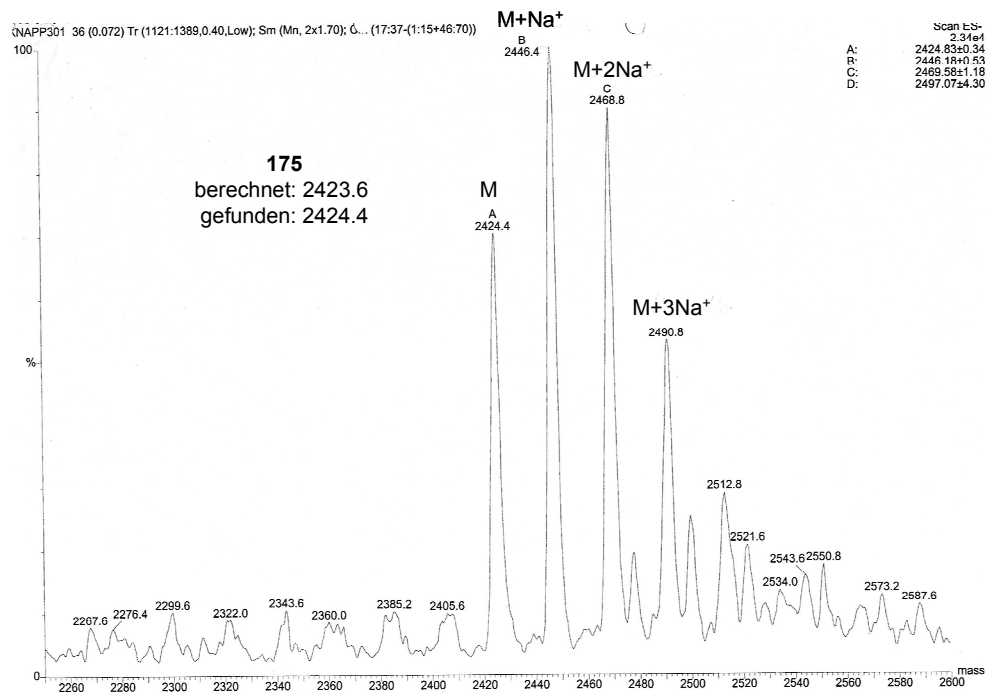
Direkt nach der beendeten Oligonukleotidsynthese wurde am Synthesizer 20 Mal mit 3 %iger TCA-Lösung in Dichlormethan (Deblock Lösung) gespült, um die *N*-Boc-geschützte Aminogruppe für die Farbstoffanbindung zu entschützen. Anschließend wurde die Säule aus dem Synthesizer entnommen, das CPG-Material in ein

Reaktionsgefäß mit Polyethylen Fritte und Hahn überführt und im Vakuum getrocknet. Die Anbindung des Farbstoffs wurde mittels des *N*-Hydroxysuccinimidyl-aktivierten Esters des Fluoresceins **172** durchgeführt. Um die Ergebnisse des Spaltungsexperiments nicht zu verfälschen musste der nicht abreagierte Farbstoff entfernt werden. Daher wurde das CPG-Material vor der TBAF-Spaltung gründlich gewaschen und getrocknet. Die Spaltung mit TBAF wurde bei 45 °C und trockenem DMF als Cosolvenz durchgeführt und das CPG Material 15 Minuten inkubiert. Die Verwendung von DMF als Cosolvenz hatte sich bei verringerter Temperatur (45 °C anstatt 60 °C) als schnellste Methode zur Spaltung der 3'-*O*-CE-Gruppe herausgestellt.<sup>[298]</sup> Nach beendeter Reaktion wurde das Filtrat bei 366 nm unter einer UV-Lampe untersucht und es konnte eine starke Fluoreszenz beobachtet werden (Foto in Schema 5-16). Das Filtrat wurde außerdem massenspektroskopisch untersucht und es konnte neben Tetrabutylammonium das Fluoreszenz-markierte Spaltungsprodukt **176** des Linkers gefunden werden (Abbildung 5-9).



**Abbildung 5-9:** ESI-Massenspektrum des Filtrats nach der TBAF Spaltung.

Die gefundene Masse entspricht der am Fluorescein decarboxylierten Verbindung **176**. Der Verlust der Carboxylgruppe war durch die Messung bedingt. Diese Ergebnisse zeigen, dass der Linker gespalten wurde, da die Fluoreszenz von dem markierten Spaltungsprodukt herrührte. Um auch die Spaltung der 3'-*O*-CE-Gruppe nachzuweisen wurde das Oligonukleotid **174** durch Behandlung mit konzentriertem Ammoniak von der festen Phase abgespalten, mittels Ionenaustausch-HPLC gereinigt und massenspektroskopisch analysiert. In der folgenden Abbildung 5-10 ist das ESI-Massenspektrum des Oligonukleotids **175** abgebildet.



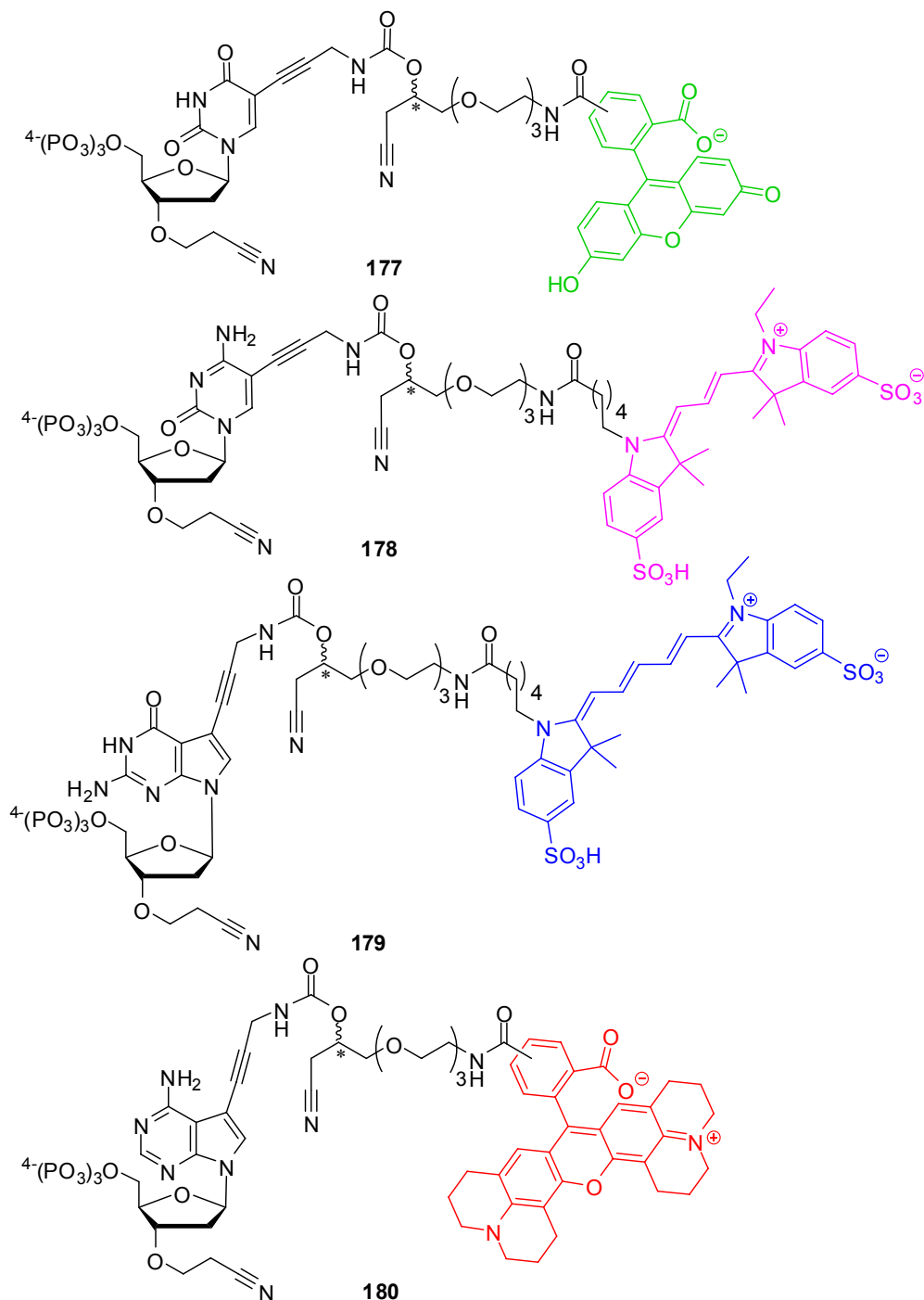
**Abbildung 5-10:** ESI-Massenspektrum des Oligonukleotids **175**.

Das Massenspektrum zeigt, dass auch die 3'-O-CE-Gruppe gespalten wurde und dass das Oligonukleotid unter den Entschützungsbedingungen stabil war.

Im Rahmen dieses Testexperiments konnte der erste Fluoreszenz-markierte, reversible Terminators hergestellt werden. Die Ergebnisse des Spaltungsexperiments zeigen, dass der entwickelte Linker und das im Rahmen des EU-Projekts entwickelte Konzept der reversiblen Terminatoren die Anforderungen an die Spaltbarkeit für einen Einsatz in einem *Sequenzierung durch Synthese*-Ansatz erfüllen. Zusammen mit den ersten, in Kapitel 3.5 beschriebenen Ergebnissen der Polymeraseakzeptanz- und Terminierungstests mit dem 3'-O-CE-modifizierten Triphosphat **43** stellen die bisher erzielten Ergebnisse eine sehr gute Grundlage für das Erreichen des Projektziels dar. Im folgenden Kapitel wird nun die Synthese aller vier Fluoreszenz-markierten, reversiblen Terminatoren beschrieben.

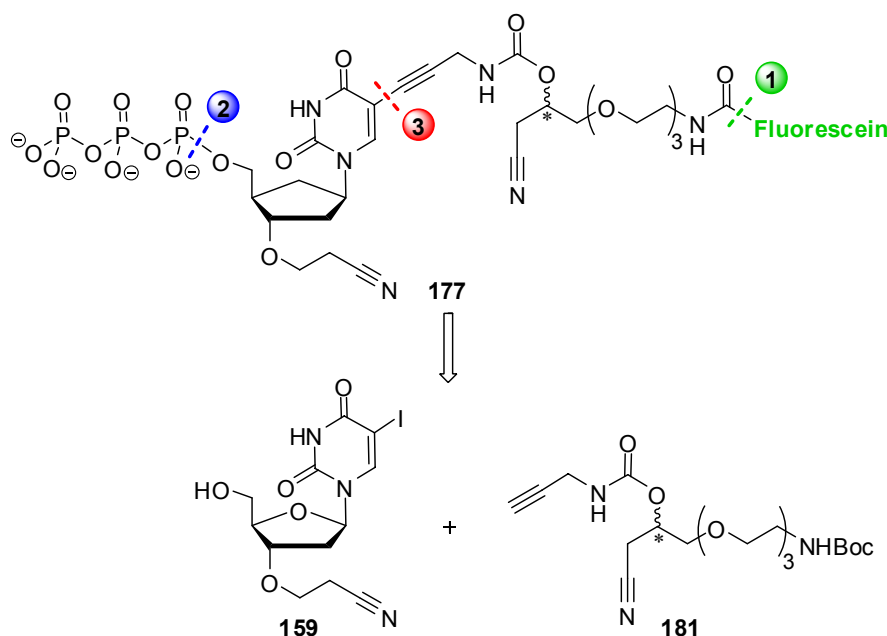
## 5.6 Synthese der vier Fluoreszenz-markierten, reversiblen Terminatoren

In Abbildung 5-11 sind die vier kompletten, reversiblen Terminatoren **177**, **178**, **179** und **180** gezeigt, deren Synthese im Folgenden vorgestellt wird.



**Abbildung 5-11:** Struktur der vier Zielmoleküle **177**, **178**, **179** und **180**.

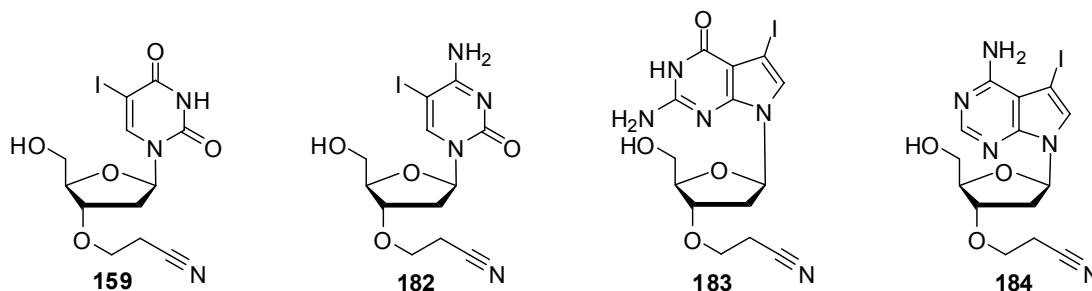
Um Sequenzanalysen mittels der *Sequenzierung durch Synthese*-Methode durchführen zu können müssen alle vier Nukleotide mit einer 5'-*O*-Triphosphateinheit, einer reversibel 3'-*O*-blockierenden Gruppe und einem spaltbaren Linker, der einen nukleotidspezifischen Fluoreszenzfarbstoff anbindet, verfügbar sein. Hier wurde für den 2'-Desoxyuridin Terminator **177** Fluorescein als Farbstoff gewählt, für den 2'-Desoxycytidin Terminator **178** Cy3, für den 2'-Desoxyguanosin Terminator **179** Cy5 und für den 2'-Desoxyadenosin Terminator **180** TexasRed. Die retrosynthetische Analyse der letzten Schritte bis zum kompletten, reversiblen Terminator, ausgehend von den 3'-*O*-CE-modifizierten Iodonukleosiden ist in Schema 5-17 am Beispiel des 2'-Desoxyuridin Terminators **177** gezeigt.



**Schema 5-17:** Retrosynthetische Analyse der reversiblen Terminatoren am Beispiel des 2'-Desoxyuridin Terminators **177**.

Der erste retrosynthetische Schritt ist die Spaltung der Linker-Farbstoff-Bindung ①. Da die *N*-Hydroxysuccinimidylester der Farbstoffe teuer und im Fall von Cy3 und Cy5 nur in kleinen Mengen (25 mg) verfügbar sind, sollte die Anbindung des Farbstoffs der letzte Schritt in der Synthese sein. Davor sollte die Triphosphateinheit an der 5'-Hydroxylgruppe aufgebaut werden ②. Der letzte Schritt ③ in der Retrosynthese und damit der erste Schritt der Synthese sollte die Einführung des Linkers **181** sein. Da hier ohnehin der reduzierte, *N*-Boc geschützte Linker, anstatt des Azido-Linkers verwendet werden muss, sollte die Anbindung durch eine Sonogashira Kupplung erfolgen. Im Vergleich zu der alternativen Methode über den aktivierten Linker **168** und das

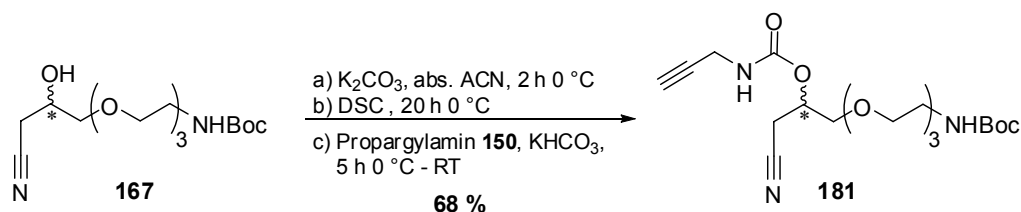
Propargylamino-modifizierte Nukleosid **162** (siehe Schema 5-15) spart die Anbindung des kompletten Linkers **181** zwei Syntheseschritte. Bei der Synthese der Fluoreszenz-markierten, reversiblen Terminatoren wurde von den in Abbildung 5-12 gezeigten, bereits 3'-O-CE-modifizierten Iodonukleosiden **159**, **182**, **183** und **184** ausgegangen. Diese wurden von *Dr. Angelika Keller* im Rahmen ihrer Doktorarbeit synthetisiert.<sup>[298]</sup>



**Abbildung 5-12:** Strukturen der 3'-O-CE modifizierte Iodonukleoside **159**, **182**, **183** und **184**.

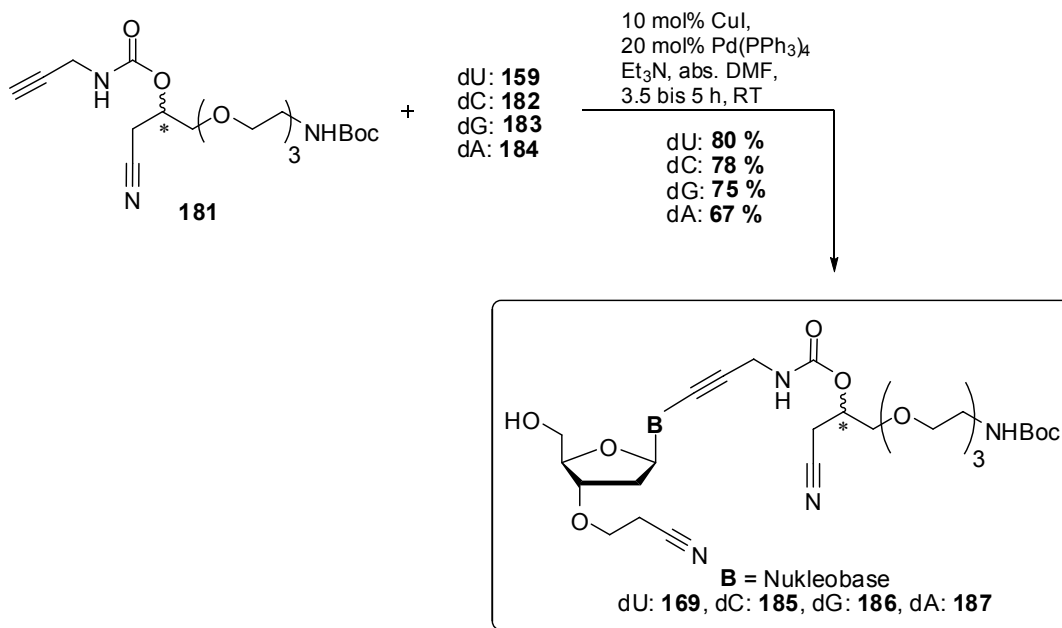
### 5.6.1 Kupplung des Linkers an die vier 3'-O-CE-Nukleoside

Für die Anbindung des Linkers durch die Sonogashira Kupplung musste zunächst der Propargylaminocarbamat-modifizierte Linker **181** hergestellt werden. Die Synthese ausgehend von dem reduzierten, *N*-Boc geschützten Linker **167** ist in Schema 5-18 dargestellt.



**Schema 5-18:** Synthese des *N*-Boc geschützten, Propargylaminocarbamat-modifizierten Linkers **181**.

Der Propargylaminocarbamat-modifizierte Linker **181** wurde analog zu dem kompletten Azido-Linker **148** in einer Eintopfreaktion durch Aktivierung der sekundären Hydroxygruppe mit DSC und anschließender Umsetzung mit Propargylamin **150** hergestellt. Der komplette Fluorid-spaltbare Linker **181** wurde mit einer Ausbeute von 68 % erhalten. Sein Einsatz in der Sonogashira Kupplung mit den vier 3'-O-CE-modifizierten Nukleosiden **159**, **182**, **183** und **184** (Abbildung 5-12) ist in Schema 5-19 gezeigt.



**Schema 5-19:** Anbindung des Linkers an alle vier 3'-O-CE-modifizierten Nukleoside **159**, **182**, **183** und **184** mittels Sonogashira Kupplung.

Die Sonogashira Kupplungen wurden mit Kupfer(I)iodid und Tetrakis(triphenylphosphan)palladium als Katalysatorsystem durchgeführt. Die Reaktionszeiten lagen zwischen dreieinhalb und fünf Stunden. Der Linker **181** konnte erfolgreich und mit guten Ausbeuten von 67-80 % an alle vier 3'-O-CE-modifizierten Nukleoside **159**, **182**, **183**, **184** gekuppelt werden. Dabei wurde die beste Ausbeute von 80 % bei der Herstellung des 2'-Desoxyuridinderivats **169** erzielt. Die vier Linker- und 3'-O-CE-modifizierten Nukleoside **169**, **185**, **186** und **187** wurden alle elementaranalysenrein erhalten und dann in der abschließenden Einführung der Triphosphateinheit und des Fluoreszenzfarbstoffs eingesetzt.

### 5.6.2 Synthese der Triphosphate und Anbindung des Fluoreszenzfarbstoffs

Alle Triphosphate **188**, **189**, **190** und **191** wurde mit der etablierten und breit anwendbaren Methode nach Ludwig und Eckstein<sup>[332]</sup> hergestellt (siehe Kapitel 3.6.4). Da im hier vorliegenden Fall der reversiblen Terminatoren die 3'-Hydroxygruppe ohnehin mit der CE-Gruppe modifiziert ist, stellt die Selektivität kein Problem dar. Allerdings wurden die Reaktionszeiten in jedem Schritt der Triphosphatsynthese um fünf bis zehn Minuten verlängert, da es sich bei den Nukleosiden **169**, **185**, **186** und **187** um stark modifizierte Bausteine handelt. Die Rohprodukte der Triphosphatsynthesen

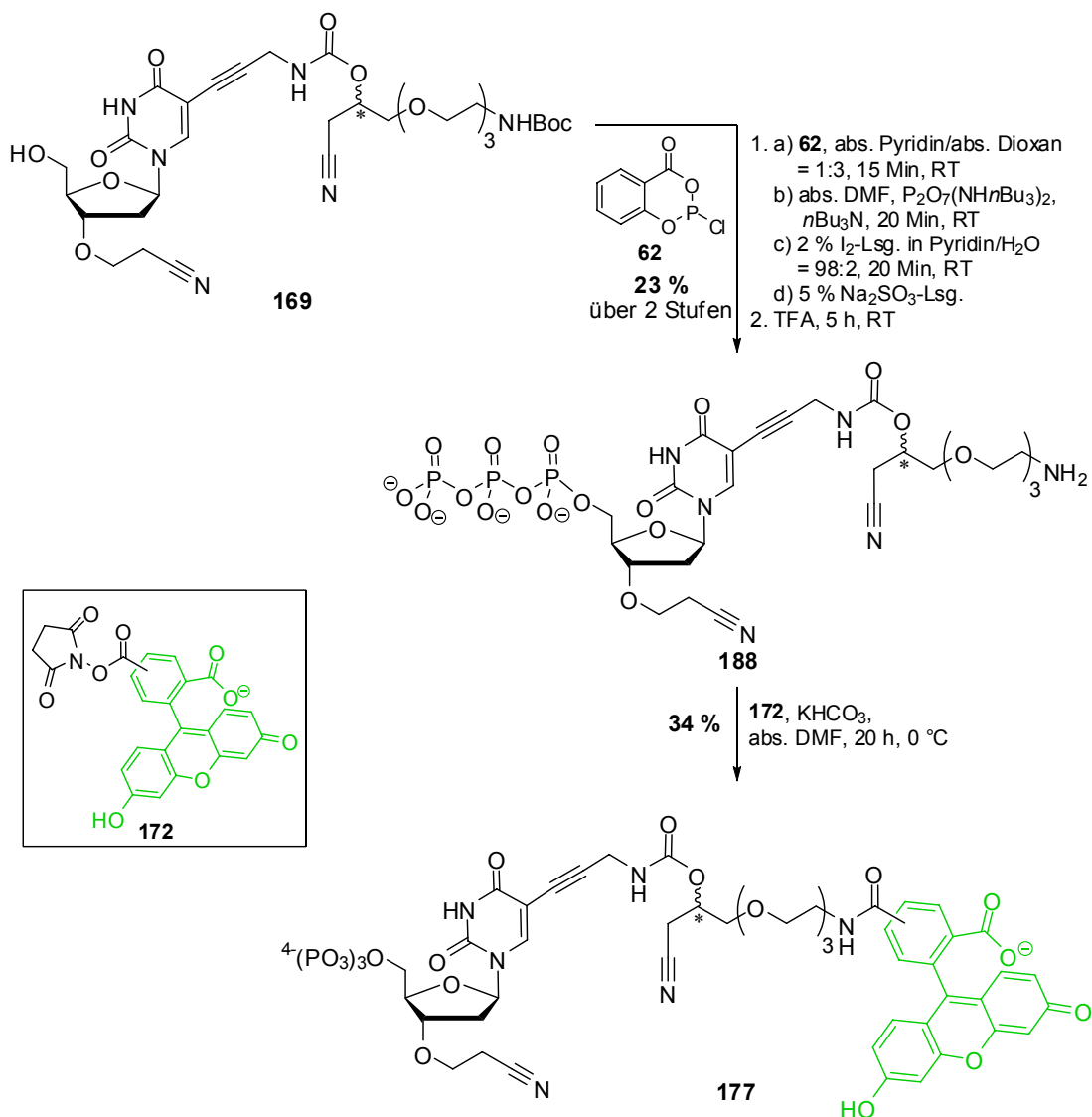
wurden anschließend mit TFA behandelt, um die *N*-Boc-geschützte Aminogruppe am Linker für die nachfolgende Farbstoffanbindung freizusetzen. Der anspruchsvollste Teil der Herstellung der Triphosphate ist ihre Reinigung, die in zwei Schritten erfolgte. Im ersten Schritt wurde eine Anionenaustauschchromatographie an einem FPLC<sup>®</sup>-System bei 4 °C durchgeführt. Es wurde Diethylaminoethyl(DEAE)-Sephacrose<sup>®</sup> Material in selbstgepackten Säulen und ein Triethylammoniumbicarbonat Puffer (pH = 8) verwendet. Zu beachten war dabei, dass der Puffer schnell altert und vor jeder Trennung der pH-Wert kontrolliert bzw. der Puffer neu hergestellt werden musste. Nach der Lyophilisierung der Produktfraktionen war der zweite Schritt dann die Reinigung durch präparativer RP-HPLC. Die Analytik erfolgte durch <sup>1</sup>H-, <sup>13</sup>C- und <sup>31</sup>P-NMR sowie Massenspektroskopie.

Die Anbindung der Farbstoffe erfolgte für alle vier Triphosphate **188**, **189**, **190** und **191** unter sehr ähnlichen Bedingungen, die in folgenden Kapiteln für jeden reversiblen Terminator **177**, **178**, **179** und **180** im Einzelnen beschrieben werden. Für die Aufreinigung der Fluoreszenz-markierten, reversiblen Terminatoren war ebenfalls eine zweistufige Prozedur notwendig, da eine hohe Reinheit für die nachfolgenden Polymeraseinkorporations- und ersten Sequenzierungstests erforderlich war. Der erste Schritt war eine RP-Chromatographie an der FPLC<sup>®</sup>-Anlage bei 4 °C. Es wurden selbstgepackte Säulen mit Octadecyl-funktionalisiertem Kieselgel verwendet. Dieser erste Schritt diente hauptsächlich dazu den freien Farbstoff vor der RP-HPLC Reinigung abzutrennen. Im zweiten Schritt, der RP-HPLC, erfolgte die Detektion parallel mit einem UV- und einem Fluoreszenzdetektor. Analysiert wurden die Fluoreszenz-markierten, reversiblen Terminatoren **177**, **178**, **179** und **180** mittels <sup>1</sup>H- und <sup>31</sup>P-NMR sowie Fluoreszenz- und Massenspektroskopie.



### 5.6.2.1 Synthese des Fluorescein-markierten, reversiblen 2'-Desoxyuridin Terminators 177

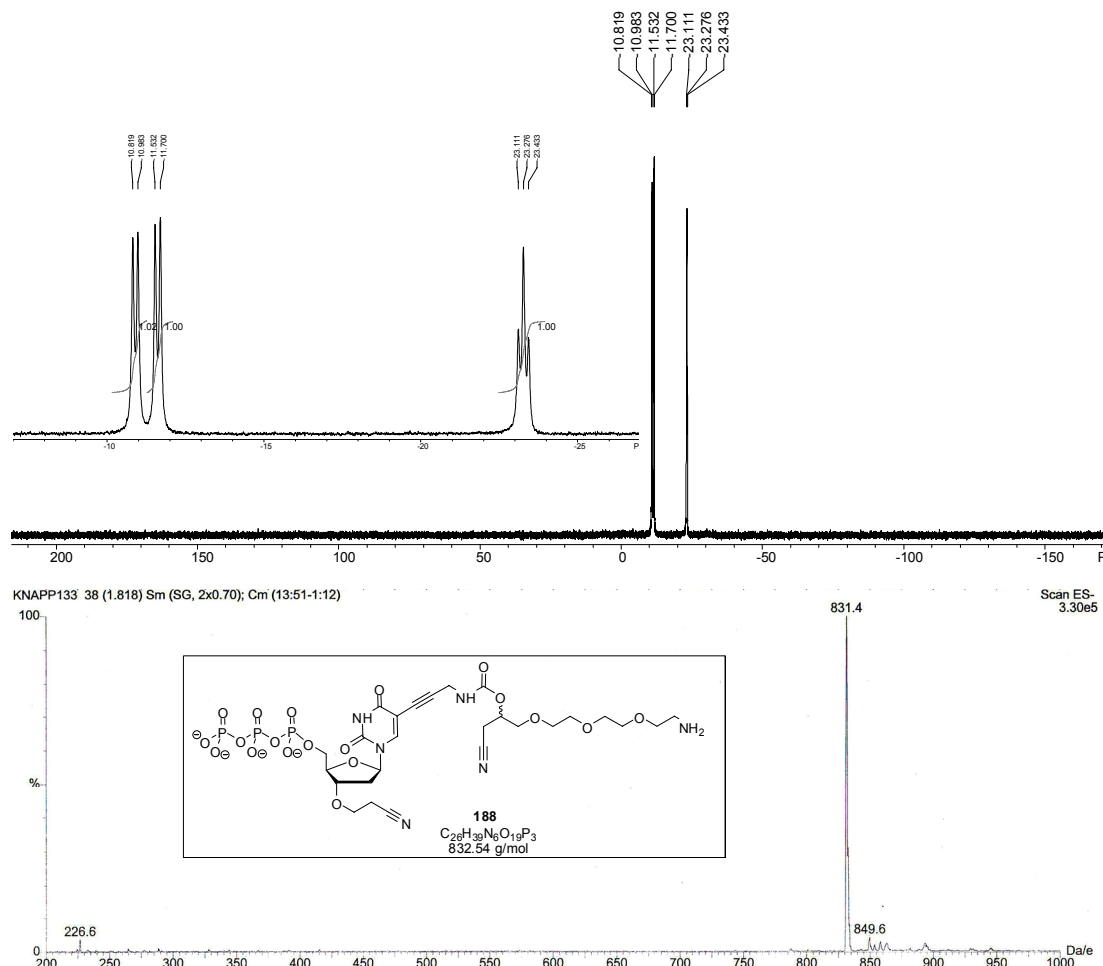
Die Synthese des Fluorescein-markierten, reversiblen Terminators **177** ist im folgenden Schema 5-20 gezeigt.



**Schema 5-20:** Triphosphatsynthese, Entschützung der Aminogruppe und Fluorescein Markierung des 2'-Desoxyuridinderivats **169**.

Die Triphosphatsynthese erfolgte wie zuvor erläutert. Nach der Synthese wurde das Lösungsmittel zunächst im Vakuum entfernt, das Rohprodukt anschließend in verdünnter TFA gelöst und fünf Stunden bei Raumtemperatur entschützt. Nach einer erneuten Trocknung folgten die beiden chromatographischen Reinigungsschritte, um möglichst reine Ausgangsverbindungen für die Farbstoffanbindung zu erhalten. Das Triphosphat **188** wurde mit einer Ausbeute von 23 % über zwei Stufen erhalten. Die

Ausbeute wurde aus dem  $^1\text{H}$ -NMR Spektrum berechnet, da das Produkt **188** nach der RP-HPLC Reinigung noch Reste von Triethylammoniumacetat aus dem verwendeten Puffer enthielt. In der folgenden Abbildung 5-13 sind das  $^{31}\text{P}$ -NMR und das ESI-Massenspektrum des Triphosphats **188** nach der RP-HPLC gezeigt.

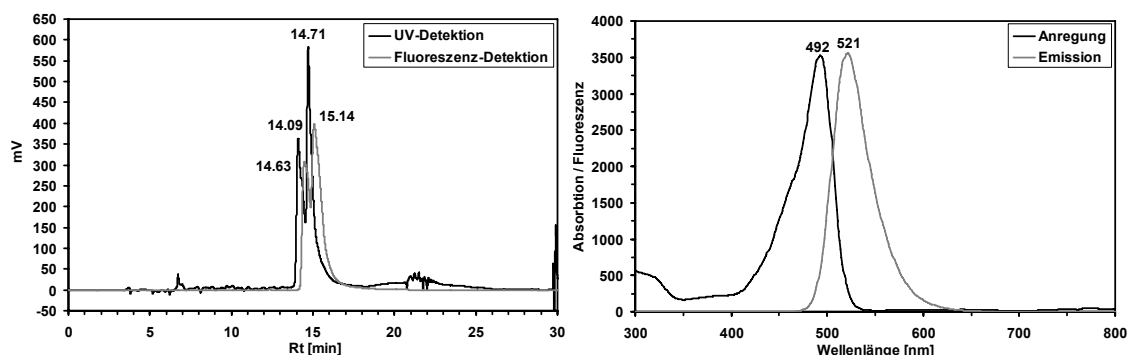


**Abbildung 5-13:**  $^{31}\text{P}$ -NMR und ESI-Massenspektrum des Triphosphats **188**.

Im  $^{31}\text{P}$ -NMR Spektrum ist nur eine phosphorhaltige Verbindung zu sehen und im Ausschnitt ist das typische Dublett/Dublett/Triplett-Aufspaltungsmuster eines Triphosphats zu erkennen. Auch das Massenspektrum zeigt die hohe Reinheit des hergestellten Triphosphats **188**.

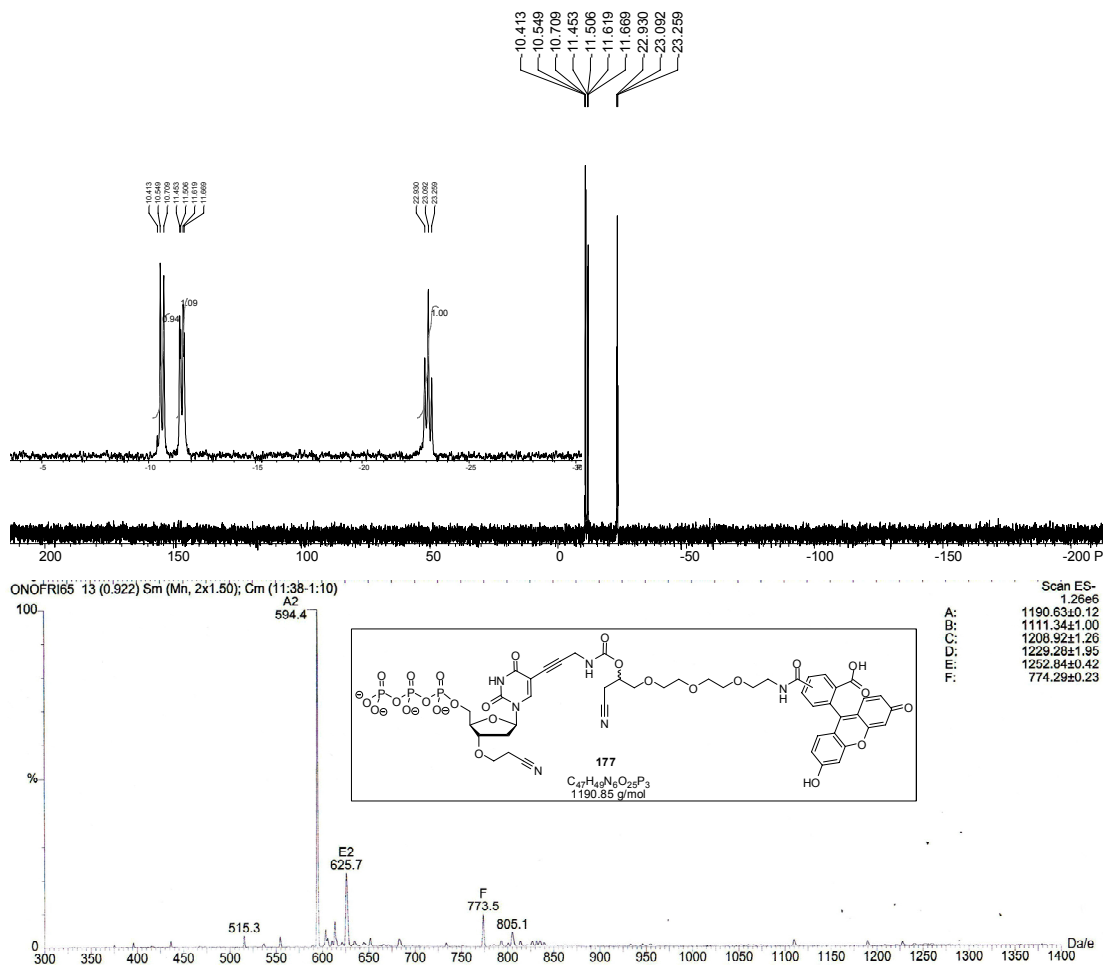
Zur Farbstoffmarkierung des Triphosphats **188** wurde das Isomerengemisch des aktivierten Farbstoffs (5-(6)-Carboxyfluorescein-(*N*-hydroxysuccinimidyl)ester **172**) eingesetzt (siehe Schema 5-20). Die Anbindung erfolgte in trockenem DMF mit Kaliumcarbonat als Base bei 0 °C. Nach den beiden Aufreinigungsschritten wurde das Fluorescein-markierte Triphosphat **177** mit einer Ausbeute von 34 % erhalten. In

Abbildung 5-14 ist das RP-HPLC Chromatogramm und das Fluoreszenzspektrum nach der zweistufigen Aufreinigung gezeigt.



**Abbildung 5-14:** Analytisches RP-HPLC Chromatogramm und Fluoreszenzspektrum des reversiblen Terminators **177**.

Im Fall des Fluorescein-markierten, reversiblen Terminators **177** konnten die beiden Isomere im RP-HPLC Chromatogramm unterschieden werden. Die längere Retentionszeit in dem Fluoreszenz-detektierten Chromatogramm resultiert daraus, dass der Fluoreszenzdetektor dem UV-Detektor nachgeschaltet war. Die weitere Analyse des ersten reversiblen Terminators wurde mittels  $^1\text{H}$ -,  $^{31}\text{P}$ -NMR und Massenspektroskopie durchgeführt. In der folgenden Abbildung 5-15 ist das  $^{31}\text{P}$ -NMR und das Massenspektrum der Verbindung **177** gezeigt.

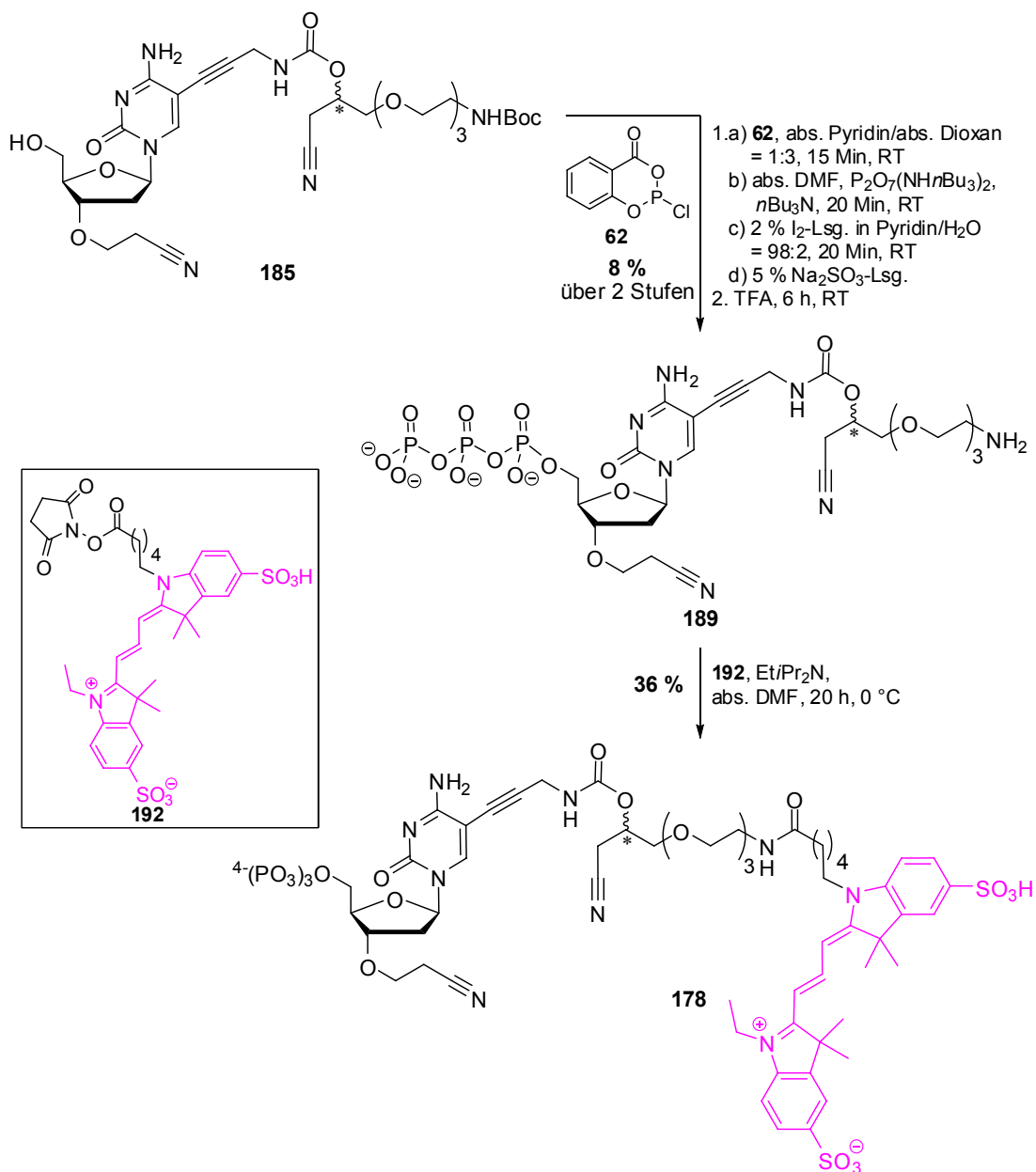


**Abbildung 5-15:**  $^{31}\text{P}$ -NMR und ESI-Massenspektrum des Fluorescein-markierten, reversiblen Terminators **177**.

Auch hier weist das  $^{31}\text{P}$ -NMR nur eine phosphorhaltige Verbindung auf und zeigt das Aufspaltungsmuster eines Triphosphats. Im Massenspektrum ist das doppelt negativ geladene Molekül der Hauptpeak. Die daraus resultierende, berechnete Masse stimmt genau mit der erwarteten Masse des Zielmoleküls überein. Der erste Fluoreszenz-markierte, reversible Terminator **177** konnte also erfolgreich in sehr guter Reinheit hergestellt werden.

### 5.6.2.2 Synthese des Cy3-markierten, reversiblen 2'-Desoxycytidin Terminator 178

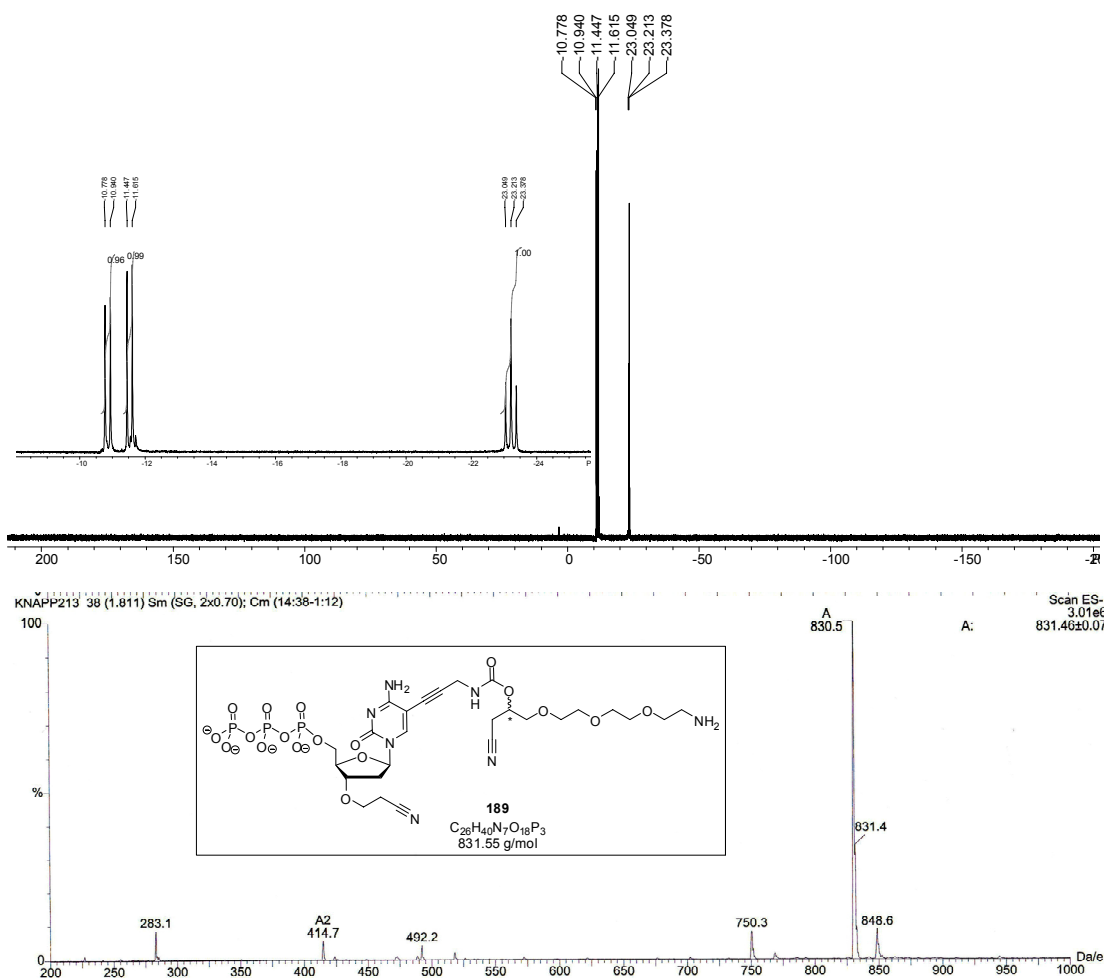
Nach der erfolgreichen Synthese des Fluorescein-markierten 2'-Desoxyuridin Terminators **177** erfolgte die des Cy3-markierten, reversiblen Terminators **178** in analoger Weise (Schema 5-21).



**Schema 5-21:** Triphosphatsynthese, Entschützung der Aminogruppe und Cy3 Markierung des 2'-Desoxycytidinderivats **185**.

Die Triphosphatsynthese wurde analog der Synthese des 2'-Desoxyuridin 5'-Triphosphats **188** mit den verlängerten Reaktionszeiten durchgeführt. Allerdings konnten hier nach der Entschützung der Aminogruppe mit TFA und der zweistufigen

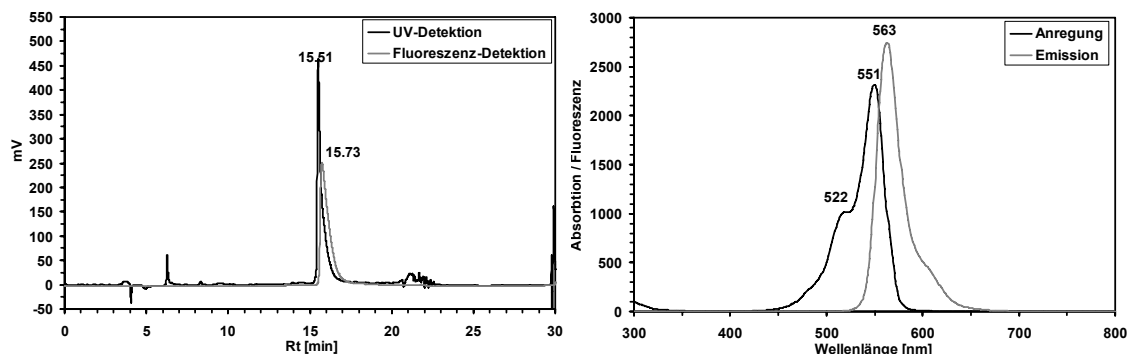
Aufreinigung nur 8 % des Triphosphats **189** erhalten werden (Ausbeute aus dem  $^1\text{H}$ -NMR Spektrum berechnet). Der Grund hierfür könnte bereits der erste Schritt der Triphosphatsynthese, die Phosphorylierung mit Verbindung **62**, gewesen sein. Es wurde kein Niederschlag von Pyridinium Hydrochlorid beobachtet, was auf eine geringe Ausbeute im Phosphorylierungsschritt hinweist. In Abbildung 5-16 sind das  $^{31}\text{P}$ -NMR und das ESI-Massenspektrum von **189** zu sehen.



**Abbildung 5-16:**  $^{31}\text{P}$ -NMR und ESI-Massenspektrum des Triphosphats **189**.

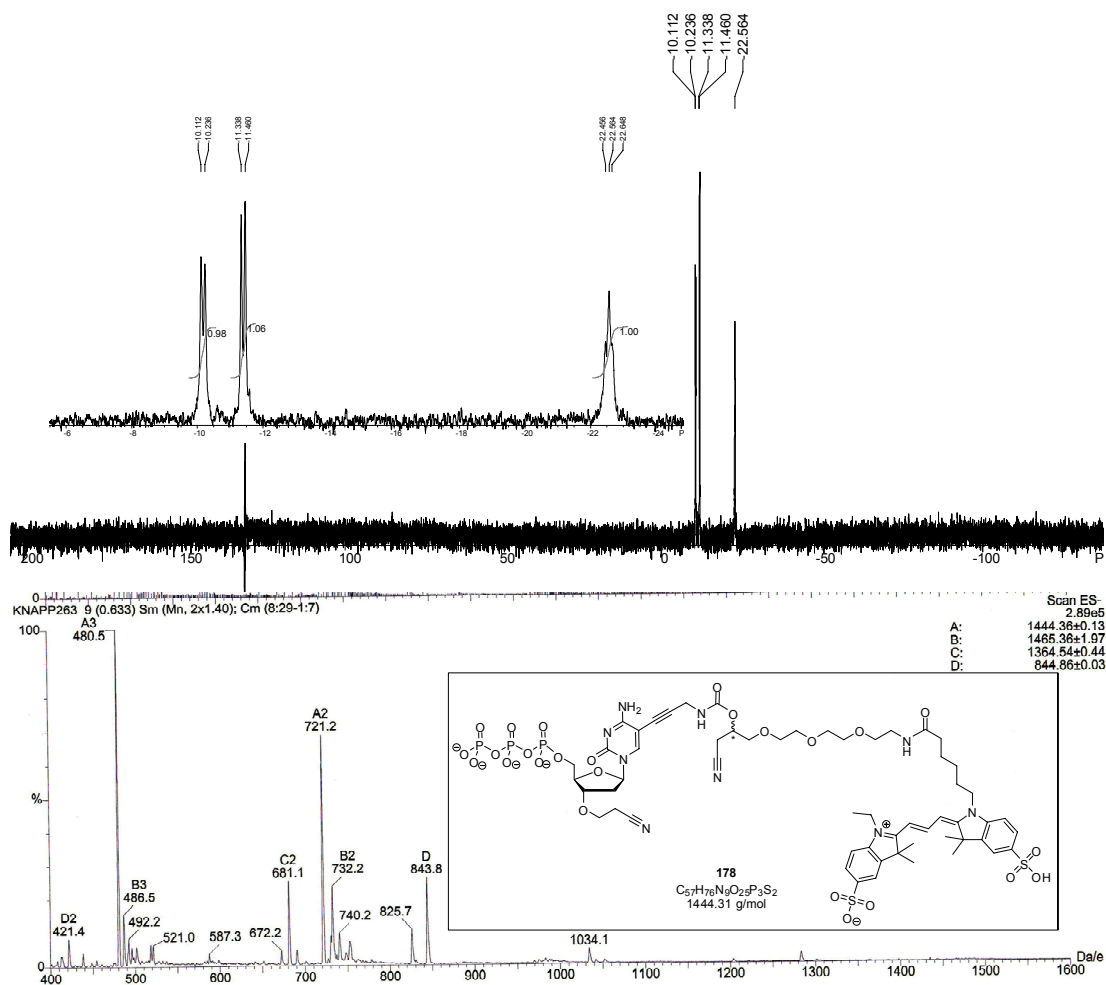
Im  $^{31}\text{P}$ -NMR Spektrum sind nur die Signale des Triphosphats **189** und das typische Aufspaltungsmuster zu sehen. Das ESI-Massenspektrum weist die Masse des einfach negativ geladenen Moleküls als Hauptpeak auf. Das Triphosphat konnte trotz der geringen Ausbeute in einer sehr hohen Reinheit hergestellt werden und die erhaltene Menge war ausreichend, um die Farbstoffmarkierung durchzuführen. Diese wurde bei Raumtemperatur mit Diisopropylethylamin als Base in trockenem DMF durchgeführt (siehe Schema 5-21). Nach den beiden Chromatographieschritten konnte das zweite

Zielmolekül, der Cy3-markierte, reversible 2'-Desoxycytidin Terminator **178**, mit einer Ausbeute von 36 % erhalten werden. In Abbildung 5-17 sind das analytische RP-HPLC Chromatogramm und das Fluoreszenzspektrum der Verbindung **178** gezeigt.



**Abbildung 5-17:** Analytisches RP-HPLC Chromatogramm und Fluoreszenzspektrum des Cy3-markierten, reversiblen Terminators **178**.

Das RP-HPLC Chromatogramm weist bei UV-Detektion eine geringe Verunreinigung bei früher Retentionszeit auf, bei Fluoreszenzdetektion ist aber nur eine fluoreszierende Substanz zu sehen. Das Fluoreszenzspektrum weist die typischen Maxima für den Cy3-Farbstoff auf. In Abbildung 5-18 sind das  $^{31}\text{P}$ -NMR und das Massenspektrum abgebildet.



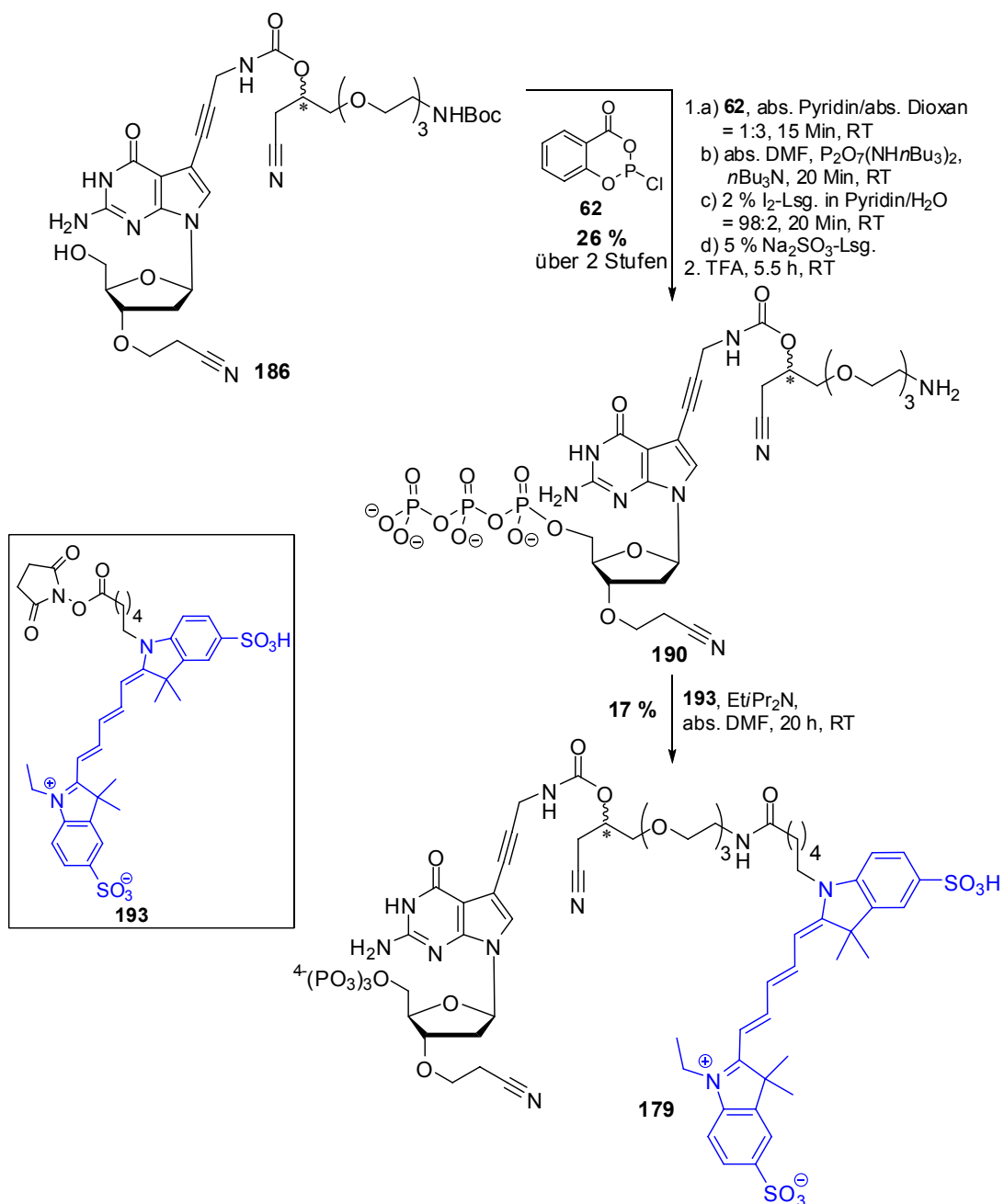
**Abbildung 5-18:**  $^{31}\text{P}$ -NMR und ESI-Massenspektrum des Cy3-markierten, reversiblen Terminators **178**.

Im  $^{31}\text{P}$ -NMR Spektrum ist nur eine phosphorhaltige Verbindung zu sehen, die das typische Triphosphat Aufspaltungsmuster aufweist. Bei 130 ppm ist ein Artefakt zu sehen. Im ESI-Massenspektrum sind die zwei- und dreifach geladenen Molekülmassen die Hauptpeaks. Die daraus resultierende, berechnete Masse entspricht genau der theoretischen. Somit konnte auch der zweite Fluoreszenz-markierte, reversible Terminator **178** in sehr guter Reinheit erfolgreich hergestellt werden.



### 5.6.2.3 Synthese des Cy5-markierten, reversiblen 2'-Desoxyguanosin Terminators 179

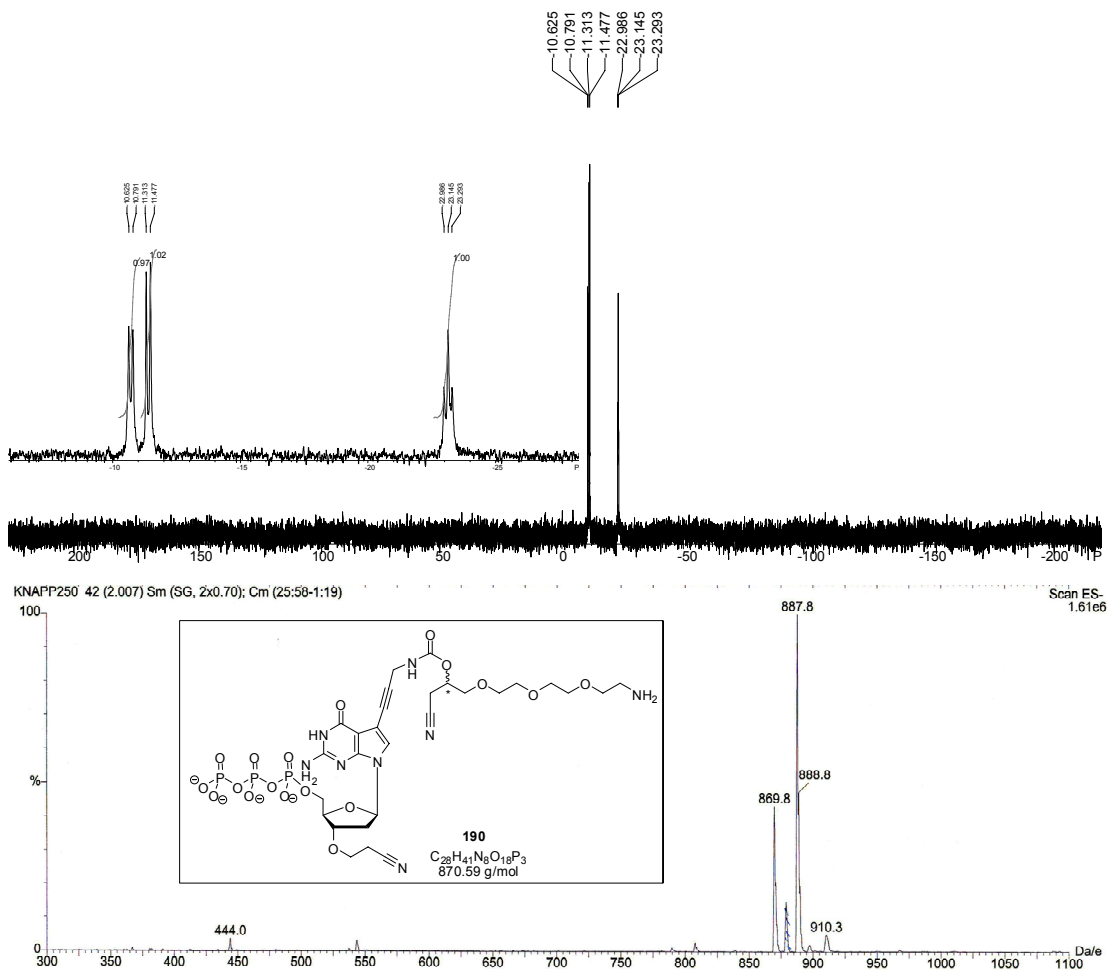
Die Synthese des dritten Fluoreszenz-markierten, reversiblen Terminators **179** ist in Schema 5-22 gezeigt.



**Schema 5-22:** Triphosphatsynthese, Entschützung der Aminogruppe und Cy5 Markierung des 2'-Desoxyguanosinderivats **186**.

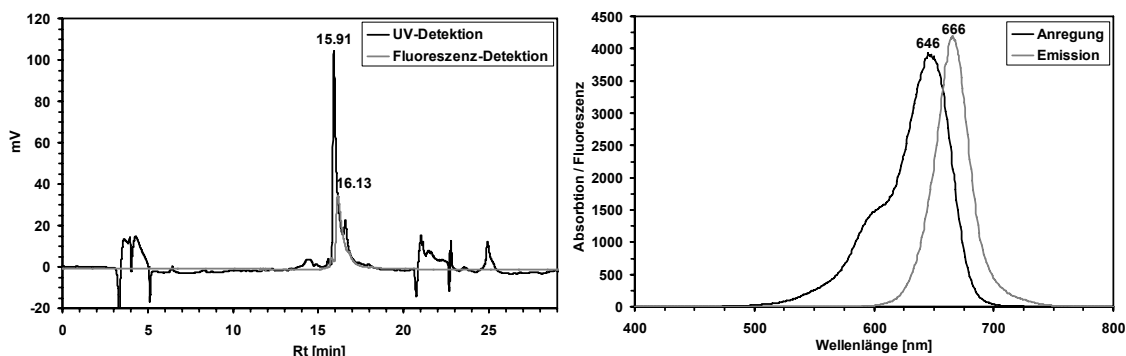
Die Triphosphatsynthese wurde analog zu den anderen beiden reversiblen Terminatoren **177** und **178** durchgeführt. Bei der Einführung der Triphosphateinheit und Entschützung der Aminogruppe konnte mit dem 2'-Desoxyguanosinderivat **186** die höchste Ausbeute

von 26 % erzielt werden. Wie die in Abbildung 5-19 abgebildeten Spektren ( $^{31}\text{P}$ -NMR und Masse) zeigen, entsprach die nach der Anionenaustauschchromatographie und RP-HPLC erreichte Reinheit den hohen Ansprüchen.



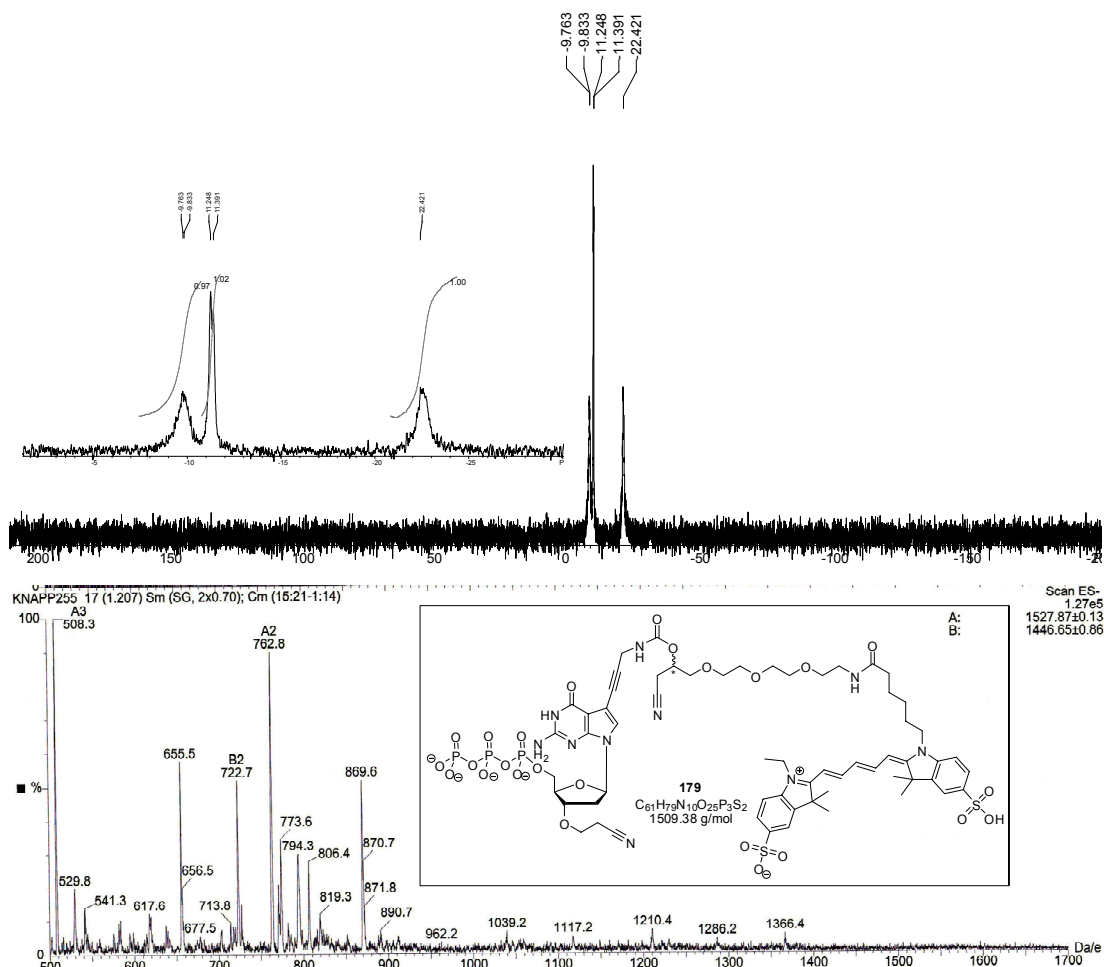
**Abbildung 5-19:**  $^{31}\text{P}$ -NMR und ESI-Massenspektrum des Triphosphats **190**.

Im  $^{31}\text{P}$ -NMR Spektrum ist nur eine phosphorhaltige Verbindung zu sehen, die die typische Duplett/Duplett/Triplett-Aufspaltung eines Triphosphats aufweist. Im ESI-Massenspektrum ist der Hauptpeak die Molekülmasse plus Ammonium, des Weiteren sind die einfach geladene Molekülmasse und die Molekülmasse plus Kalium zu sehen. Das Triphosphat **190** wurde dann zur Farbstoffmarkierung mit Cy5-*N*-hydroxysuccinimidylester **193** unter den gleichen Bedingungen wie das 2'-Desxycytidin-5'-riphosphat **189** umgesetzt. Nach der zweistufigen Aufreinigung wurde der Cy5-markierte, reversible Terminator **179** mit einer Ausbeute von 17 % erhalten. In der folgenden Abbildung 5-20 sind das RP-HPLC Chromatogramm und das Fluoreszenzspektrum gezeigt.



**Abbildung 5-20:** Analytisches RP-HPLC Chromatogramm und Fluoreszenzspektrum des Cy5-markierten, reversiblen Terminators **179**.

Im analytischen RP-HPLC Chromatogramm handelt es sich bei den Ausschlägen zu Beginn und Ende des Chromatogramms um Störsignale. Diese sind hier ausgeprägter als in den anderen Chromatogrammen, da die Konzentration des Analyten **179** in dieser Probe geringer war. Das UV-Chromatogramm weist eine Verunreinigung als Schulter des Signals der Zielverbindung bei 16.13 Minuten auf. Da im Fluoreszenz-Chromatogramm keine Schulter zu sehen ist, handelt es sich nicht um eine fluoreszierende Verunreinigung. Es könnte sich um das nicht Fluoreszenz-markierte Triphosphat **190** handeln. Das Fluoreszenzspektrum weist die typischen Signale für den Cy5-Farbstoff auf. In Abbildung 5-21 sind das  $^{31}\text{P}$ -NMR und das ESI-Massenspektrum der Verbindung **179** gezeigt.



**Abbildung 5-21:**  $^{31}\text{P}$ -NMR und ESI-Massenspektrum des Cy5-markierten, reversiblen Terminators **179**.

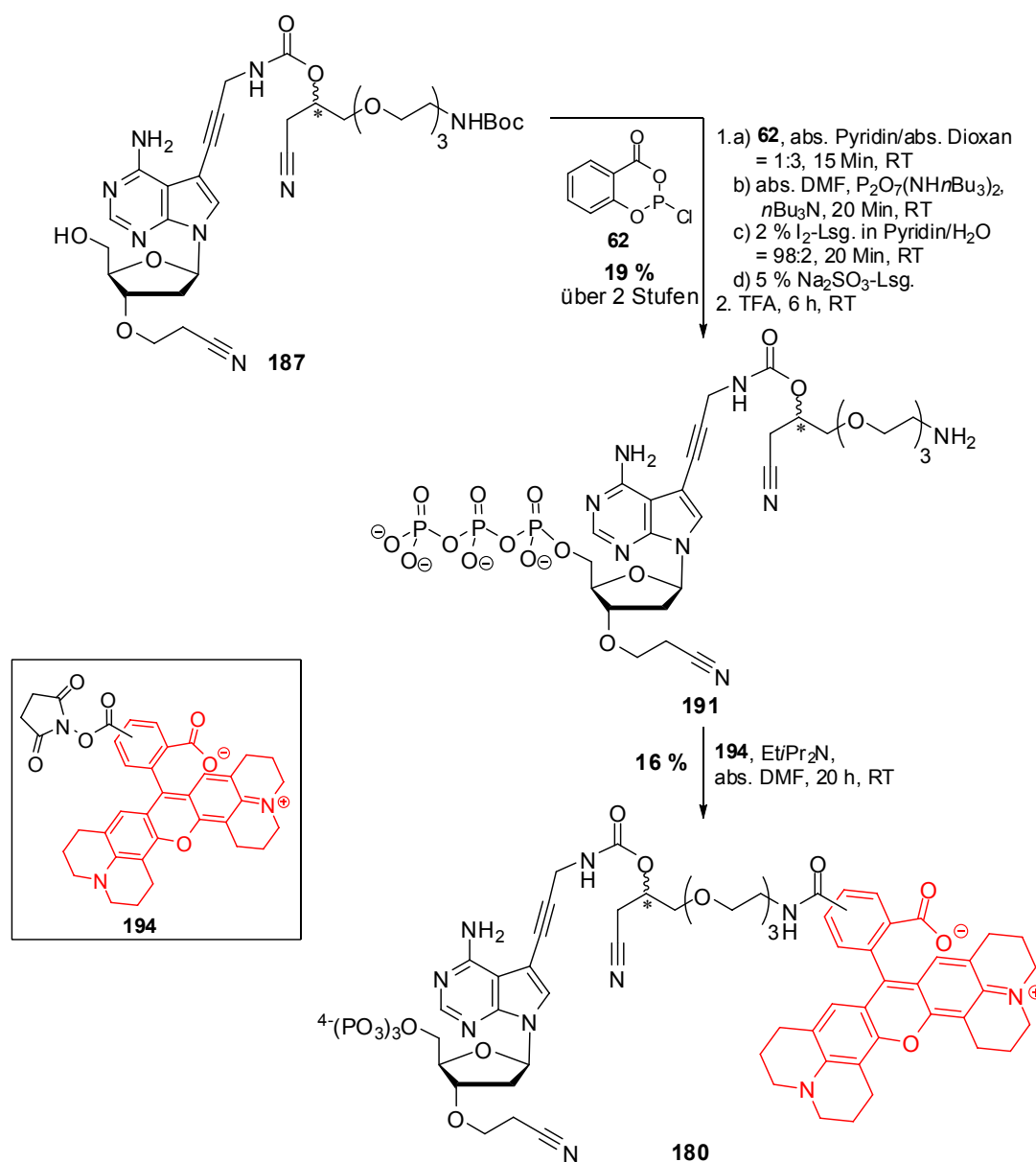
Die Vermutung der Anwesenheit des unmarkierten Triphosphats als Verunreinigung wird durch das ESI-Massenspektrum bestätigt. Dort wurden als Hauptpeaks die zwei- und dreifach geladene Masse des Zielmoleküls plus Ammonium (A2, A3) gefunden. Daneben ist ein weiteres Signal das durch die Messung erzeugte zweifach geladene Diphosphat (B2) des Zielmoleküls zu sehen. Die Masse von 869.6 entspricht dem Edukt **190**. Bei der Masse von 655.5 handelt es sich um die freie Säure des Cy5-Farbstoffs, die ebenfalls nicht vollständig abgetrennt werden konnte. Das  $^{31}\text{P}$ -NMR Spektrum weist nur Signale einer Triphosphatstruktur auf. Allerdings sind diese zu breit, um die Signale des Edukts **190** und des Produkts **179** unterscheiden zu können.

Die Reinheit des Cy5-markierten, reversiblen 2'-Desoxyguanosin Terminators **179** ist nicht so hoch, wie die der anderen zwei Fluoreszenz-markierten, reversiblen Terminatoren **177** und **178**. Aufgrund der geringen Menge konnte auch keine weitere Reinigung mehr vorgenommen werden. Die Anwesenheit des freien Farbstoffs sollte

aber für die geplanten Tests kein Problem darstellen, da dieser im Waschschrift entfernt wird. Bei dem unmarkierten Triphosphat **190** handelt es sich ebenfalls um einen reversiblen Terminator. Daher verfälscht seine Anwesenheit nur die Fluoreszenzdetektion des Cy5-Farbstoffs, nicht aber die Primerverlängerung an sich. Da keine absoluten Einbaueffizienzen anhand der detektierten Fluoreszenzsignalen bestimmt wurden, ist durch das nicht markierte Triphosphat **190** keine Störung des ersten Anwendungsexperiments zu erwarten (siehe Kapitel 5.7).

### 5.6.2.4 Synthese des TexasRed-markierten, reversiblen 2'-Desoxyadenosin Terminators 180

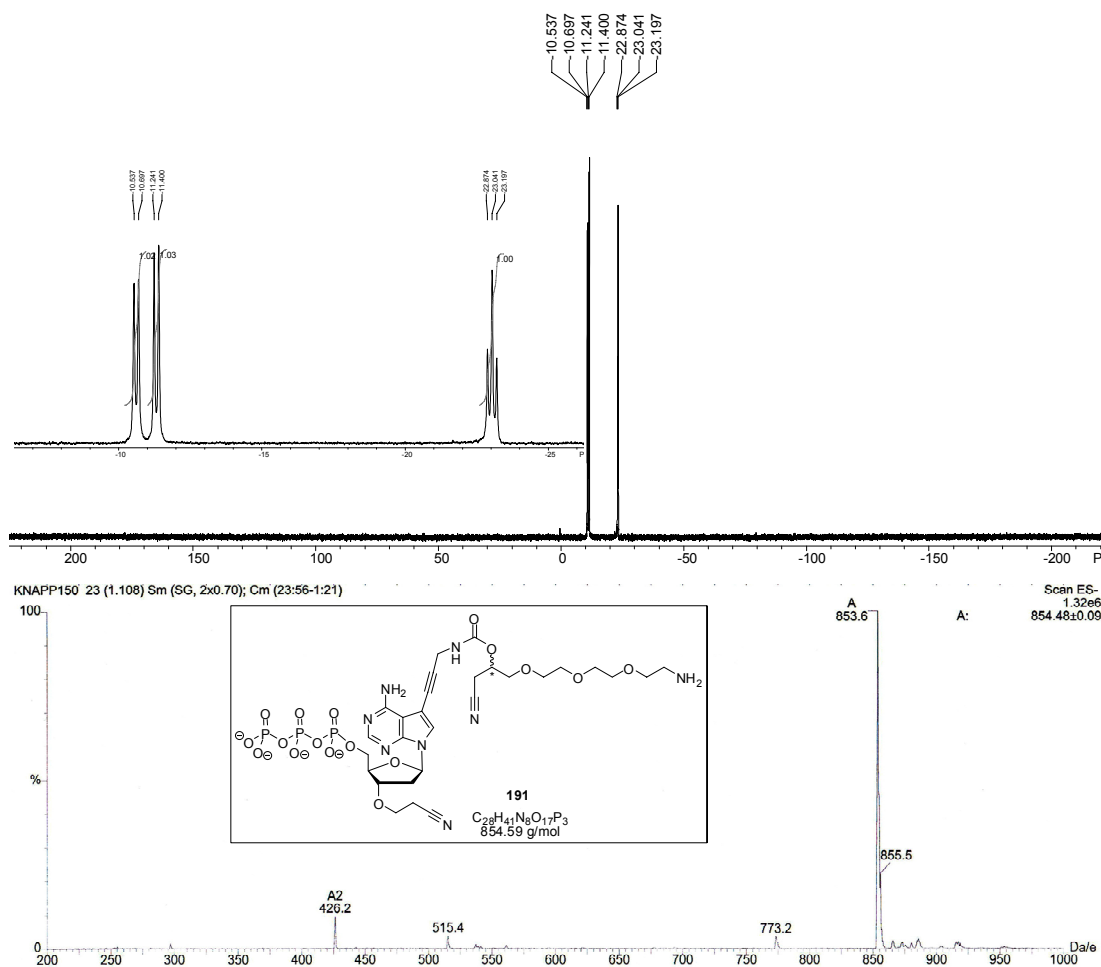
Die Synthese des letzten Fluoreszenz-markierten, reversiblen Terminators **180** ist in Schema 5-23 gezeigt.



**Schema 5-23:** Triphosphatsynthese, Entschützung der Aminogruppe und TexasRed Markierung des 2'-Desoxyadenosinderivats **187**.

Die Triphosphatsynthese wurde entsprechend den drei vorangehenden durchgeführt. Nach der anschließenden Entschützung der Aminogruppe mit TFA und der zweistufigen Aufreinigung konnte das Triphosphat **191** mit einer Ausbeute von 19 % erhalten werden. Wobei auch hier die Ausbeute aus dem  $^1\text{H}$ -NMR Spektrum berechnet wurde. In Abbildung 5-22 sind das  $^{31}\text{P}$ -NMR und das ESI-Massenspektrum des

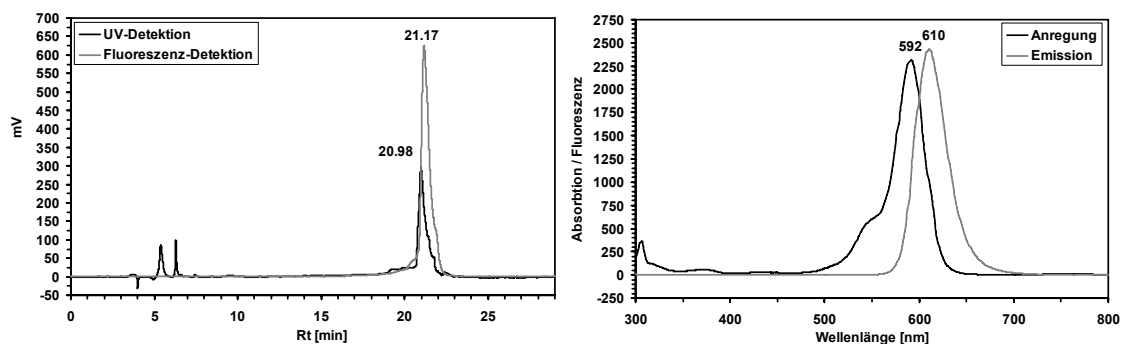
Triphosphats **191** nach der Aufreinigung durch Anionenaustausch-FPLC und RP-HPLC gezeigt.



**Abbildung 5-22:**  $^{31}\text{P}$ -NMR und ESI-Massenspektrum des Triphosphats **191**.

Im  $^{31}\text{P}$ -NMR Spektrum ist nur eine phosphorhaltige Verbindung zu sehen und im Ausschnitt ist die typische Aufspaltung der Triphosphateinheit zu erkennen. Das Massenspektrum zeigt die erwartete Masse sowie den zweifach negativ geladenen Molpeak (A2).

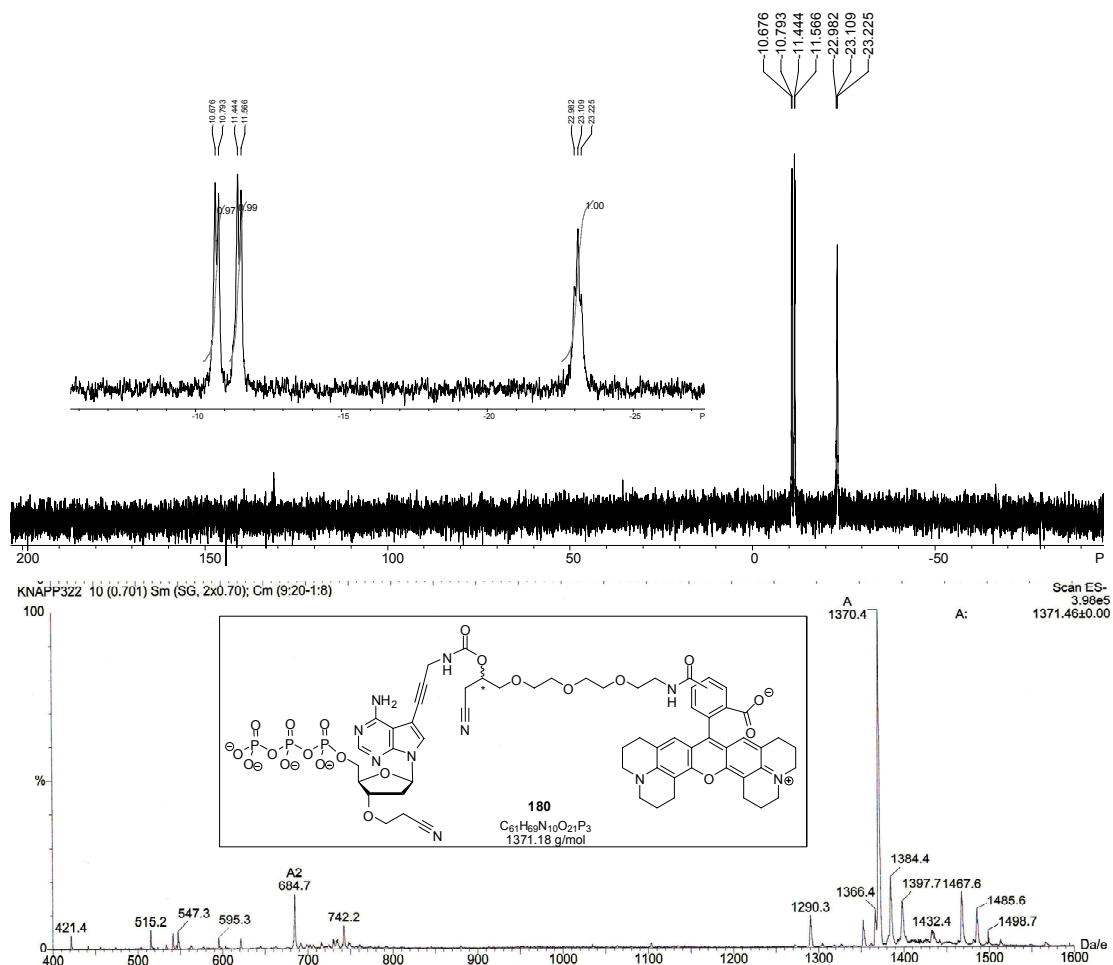
Die Anbindung des TexasRed-Fluoreszenzfarbstoffs wurde ebenfalls in DMF mit Diisopropylethylamin als Base bei Raumtemperatur durchgeführt (siehe Schema 5-23). Der Farbstoff wurde wie im Fall des Fluoresceins als Isomerengemisch (5-(6)-CarboxyTexasRed-(*N*-hydroxysuccinimidyl)ester **194**) eingesetzt. In Abbildung 5-23 sind das analytische RP-HPLC Chromatogramm und das Fluoreszenzspektrum des TexasRed-markierten, reversiblen Terminators **180** nach der zweistufigen Reinigung gezeigt.



**Abbildung 5-23:** Analytisches RP-HPLC Chromatogramm und Fluoreszenzspektrum des TexasRed-markierten, reversiblen Terminators **180**.

Im Fall des TexasRed sind die beiden Stereoisomere im RP-HPLC Chromatogramm nicht unterscheidbar. In dem mittels Fluoreszenz detektierten Chromatogramm ist nur eine fluoreszierende Spezies zu sehen, im UV-Chromatogramm sind noch zwei Verunreinigungen mit früher Retentionszeit zu erkennen. Damit ist die Reinheit des vierten Fluoreszenz-markierten Terminators **180** im RP-HPLC Chromatogramms etwas geringer, als die der ersten beiden reversiblen Terminatoren **177** und **178** aber immer noch hoch genug, wie das  $^{31}\text{P}$ -NMR Spektrum in der nächsten Abbildung zeigt.





**Abbildung 5-24:**  $^{31}\text{P}$ -NMR und ESI-Massenspektrum des TexasRed-markierten, reversiblen Terminators **180**.

Das  $^{31}\text{P}$ -NMR Spektrum zeigt nur eine phosphorhaltige Verbindung und auch die gefundene Masse entspricht genau der berechneten. Im Gegensatz zum Fluorescein-markierten, reversiblen Terminator **177** ist hier die einfach negativ geladene Masse der Hauptpeak. Die Qualität des TexasRed-markierten Terminators **180** entspricht den Anforderungen für die Polymeraseakzeptanz- und Sequenzierungstests. Damit konnte der vierte Fluoreszenz-markierte, reversible Terminator **180** ebenfalls erfolgreich synthetisiert und in sehr guter Qualität erhalten werden.

Zusammenfassend ist festzuhalten, dass mit der in Schema 5-17 vorgestellten Synthesestrategie alle vier Fluoreszenz-markierten, reversiblen Terminatoren **177**, **178**, **179** und **180** in ausreichenden Mengen und mit guten bis sehr guten Reinheiten hergestellt werden konnten. Die synthetisierten Zielmoleküle **177**, **178**, **179** und **180** wurden dann zu Polymeraseinkorporationstests und ersten Sequenzierungsexperimenten

an immobilisierten Templaten eingesetzt. Diese Experimente wurden in Tartu, Estland durch unsere Kooperationspartner *Dr. Saulius Serva (Fermentas UAB)*, *Prof. Ants Kurg* und *Priit Tomson (Asper Biotech)* durchgeführt. Die Ergebnisse sind im folgenden Kapitel beschrieben.

## 5.7 Polymeraseakzeptanz und erste Anwendung der vier reversiblen Terminatoren

### 5.7.1 Inkorporationsversuche mit der reversen Transkriptase *RevertAid™ M-MuLV*

In Kapitel 3.5.1 wurden bereits die Versuchsreihen zur Auffindung eines geeigneten Enzyms beschrieben. Diese wurden mit 3'-O-CE-2'-Desoxythymidin-5'-O-triphosphat **43** als Substrat durchgeführt. Als bestes Enzym stellte sich dabei eine bereits bekannte, von *Fermentas* entwickelte reverse Transkriptase (*RevertAid™ M-MuLV*) heraus. Da die 3'-Modifikation die Hauptschwierigkeit bei der Akzeptanz der reversiblen Terminatoren darstellt, wurden für die Fluoreszenz-markierten Derivate keine weiteren Versuchsreihen mehr durchgeführt. Die Inkorporationsexperimente mit **177**, **178**, **179** und **180** wurden mit dem gleichen Enzym und den gleichen Templaten, wie für das 3'-CE-modifizierte Triphosphat **43** beschrieben (siehe Kapitel 3.5.1), durchgeführt. In Tabelle 5-4 sind die Sequenzen des Primers und der vier Templatstränge gezeigt.

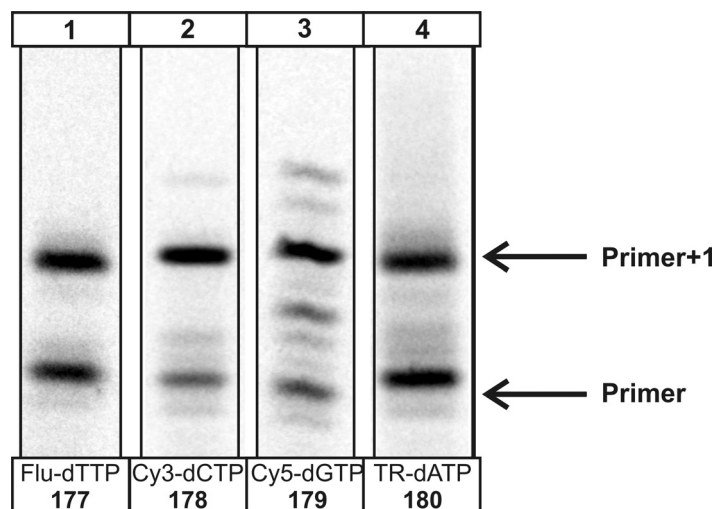
**Tabelle 5-4:** Sequenzen des Primers und der Template für die Inkorporationsversuche.

Strang	Sequenz	Länge
Primer	5'-*TGCAGGCATGCAAGCTTGGCGTA <sup>[a]</sup>	23 nt
Templat dT	3'- ACGTCCGTACGTTCGAACCGCATAAAAAAAAAAAA <sup>[b]</sup>	35 nt
Templat dC	3'- ACGTCCGTACGTTCGAACCGCATGGGGAAAAAAAA <sup>[b]</sup>	35 nt
Templat dG	3'- ACGTCCGTACGTTCGAACCGCATCCCCCCCCCCCC <sup>[b]</sup>	35 nt
Templat dA	3'- ACGTCCGTACGTTCGAACCGCATTTTTTTTTTTTT <sup>[b]</sup>	35 nt

<sup>[a]</sup>Der Primerstrang ist an der mit einem Stern gekennzeichneten Stelle (\*) mit dem radioaktiven <sup>33</sup>P-Isotop markiert. <sup>[b]</sup>Das Nukleotid im Templatstrang, welches das nächste, einzubauende Nukleotid im Primerstrang codiert ist fett dargestellt.

Vor dem Einsatz in den Inkorporationsexperimenten wurden die vier Fluoreszenz-markierten, reversiblen Terminatoren **177**, **178**, **179** und **180** bei *Fermentas* nochmals durch das „mop-up“ Verfahren aufgereinigt.<sup>[295]</sup> Das ist ein enzymatisches Verfahren zur Entfernung von eventuell enthaltenen, 3'-unmodifizierten Nukleotiden. Diese würden die Ergebnisse verfälschen, da sie die Polymerasereaktion nicht terminieren und außerdem bevorzugt durch die Polymerase eingebaut werden. Anschließend wurden die Einbauexperimente der Fluoreszenz-markierten, reversiblen Terminatoren **177**, **178**, **179** und **180** unter den im Folgenden beschriebenen Bedingungen durchgeführt.

Als erstes wurde der Primer an das jeweilige Templat durch fünfminütiges Erhitzen auf 95 °C und schrittweises Abkühlen auf Raumtemperatur innerhalb von zwei Stunden hybridisiert. Die Reaktion wurde dann in einem Reaktionsvolumen von 20 µL des Reaktionspuffers (33 mM Trisacetat, pH = 7.9, 10 mM Magnesiumacetat, 66 mM Kaliumacetat und 0.1 mg/ml Bovine Serumalbumin (BSA)) mit 10 nM Konzentration des DNA-Doppelstrangs, 50 µM Konzentration des jeweiligen modifizierten Nukleotids **177**, **178**, **179** bzw. **180** und 1 µM Konzentration der *RevertAid™ M-MuLV* Polymerase durchgeführt. Die Inkubationszeit bei 37 °C betrug insgesamt 60 Minuten. Proben aus der Reaktionsmischung wurde zu verschiedenen Zeitpunkten durch Zugabe des STOP-Puffers (95 % Formamid und 100 mM EDTA) beendet und mittels 15 %igem, denaturierendem (7 M Harnstoff) Polyacrylamidgel (29:1) bei 50 °C aufgetrennt. Das Gel wurde anschließend auf einem Whatman Papier getrocknet und mit einem FUJI Phosphorimager analysiert. In Abbildung 5-25 ist die Gelanalyse nach fünf Minuten Reaktionszeit abgebildet.



**Abbildung 5-25:** Polyacrylamidgelanalyse des enzymatischen Akzeptanzexperiments nach fünf Minuten Reaktionszeit.

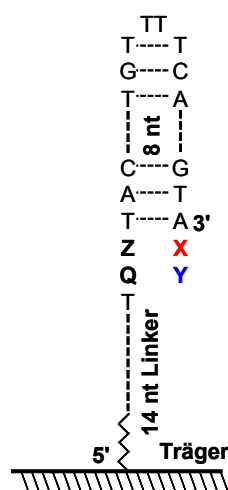
Das Gelbild zeigt, dass alle vier Fluoreszenz-markierten, reversiblen Terminatoren **177**, **178**, **179** und **180** von der reversen Transkriptase eingebaut werden und dass nach fünf Minuten bereits ein Großteil des Primers verlängert wurde.

Damit sind alle Voraussetzungen für das erste Anwendungsexperiment mit immobilisierten Hairpin-Templaten erfüllt. Der Linker und die 3'-O-CE-Gruppe sind unter einheitlichen Bedingungen spaltbar<sup>[348,350]</sup> (siehe auch Kapitel 5.4 und 5.5), alle vier Fluoreszenz-markierten, reversiblen Terminatoren **177**, **178**, **179** und **180** konnten

erfolgreich synthetisiert (siehe Kapitel 5.6.2) und durch die ausgewählte reverse Transkriptase in einen DNA-Doppelstrang eingebaut werden.

### 5.7.2 Erstes Anwendungsexperimente mit immobilisierten Hairpin-Templaten

Das Ziel dieses ersten Anwendungstests war die Durchführung von zwei Verlängerungszyklen an immobilisierten Templaten. Als Träger für die Template wurden *CodeLink*<sup>®</sup> Slides von *SurModics* verwendet. Der Glaskern dieser Träger ist mit einem Polymer beschichtet, so dass sie zusammen mit Fluoridionen verwendet werden können. Bei einem vorangegangenen Test mit immobilisierten DNA-Doppelsträngen wurde eine Dehybridisierung durch Spaltung der Wasserstoffbrückenbindungen unter den Entschützungsbedingungen mit TBAF beobachtet. Um die Zugabe und Hybridisierung neuer Templatstränge an die immobilisierten Primerstränge zu umgehen, wurden für dieses erste Anwendungsexperiment Hairpin-Oligonukleotide als Primer bzw. Template verwendet. Durch die Arbeitsgruppe von *Prof. Mado Remm*, an der Universität in Tartu, die sich mit den bioinformatischen Fragestellungen des Projekts befassten, wurden geeignete Sequenzen für die Hairpin-Oligonukleotide entwickelt. So wurde ein Set von 16 Hairpin-Oligonukleotiden verwendet, die alle Kombinationen aus zwei aufeinander folgenden Inkorporationsschritten abdeckten. In Abbildung 5-26 ist die allgemeine Sequenz der verwendeten Hairpin-Oligonukleotide gezeigt.



**Abbildung 5-26:** Allgemeine Struktur der verwendeten Hairpin-Oligonukleotide. **Z, Q:** Templatnukleotide; **X, Y:** einzubauende Nukleotide.

Die Hairpin-Oligonukleotide enthielten am 5'-Ende eine C6-Aminomodifikation, durch die sie auf den *CodeLink*<sup>®</sup> Trägern angebunden wurden. Ein 14 Nukleotide langer Spacer diente als Abstandshalter der Verlängerungsstelle von der Oberfläche des Trägers. Die Nukleotide **Z** und **Q** im Templatteil dirigieren die Nukleotide **X** und **Y**, die im ersten (**X**) bzw. im zweiten (**Y**) Schritt eingebaut werden sollen. **X** ist also komplementär zu **Z** und **Y** zu **Q**. Die Anordnung der 16 unterschiedlichen Oligonukleotide auf dem Träger ist in Abbildung 5-27 gezeigt.

<b>Y</b> \ <b>X</b>	G	A	T	C
G	GG	AG	TG	CG
A	GA	AA	TA	CA
T	GT	AT	TT	CT
C	GC	AC	TC	CC

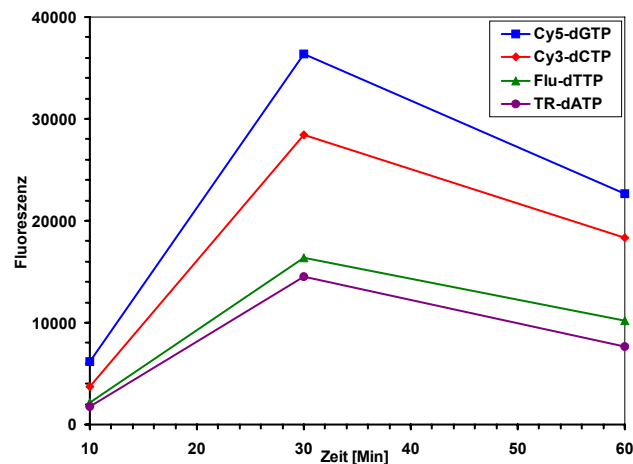
  

**Abbildung 5-27:** Anordnung der 16 unterschiedlichen Hairpin-Oligonukleotide auf dem Träger.

Jedes der 16 Hairpin-Oligonukleotide wurde in einem der 16 Quadrate in Form von vier Punkten aufgebracht. Dabei zeigen die roten Buchstaben die im ersten Verlängerungsschritt erwarteten Nukleotide an, die blauen Buchstaben die im zweiten Verlängerungsschritt erwarteten Nukleotide. Die Anordnung wurde so gewählt, dass die Fluoreszenzsignale der im ersten Schritt eingebauten Nukleotide in vertikaler Ausrichtung erscheinen. Die Fluoreszenzsignale der im zweiten Schritt eingebauten Nukleotide erscheinen in horizontaler Ausrichtung. Aufgebracht wurden die Oligonukleotide als Lösungen verschiedener Konzentration (2.5  $\mu\text{M}$ , 10  $\mu\text{M}$ , 25  $\mu\text{M}$ ) in 100 mM Carbonat-Puffer, pH = 9.0 mittels einem *VersArray ChipWriter Pro* arrayer von *BioRad Laboratories*. Dabei wurde auf einem Träger jede Verdünnung zweimal in der in Abbildung 5-27 gezeigten Anordnung aufgetragen. Nach der Immobilisierung der Oligonukleotide wurden die nicht genutzten Bindungsstellen auf dem Träger entsprechend den Anweisungen des Herstellers blockiert.

Vor dem zweistufigen Inkorporationsexperiment wurde die optimale Inkubationszeit mit allen vier Fluoreszenz-markierten, reversiblen Terminatoren **177**, **178**, **179** und **180**

und der reversiblen Transkriptase an immobilisierten Templaten untersucht. Die Ergebnisse sind in Abbildung 5-28 gezeigt.



**Abbildung 5-28:** Bestimmung der optimalen Inkubationszeit mit der DNA-Polymerase *RevertAid<sup>TM</sup>*.

Gezeigt sind hier die relativen Intensitäten der einzelnen Reaktionen. Die Ergebnisse zeigen für alle Fluoreszenz-markierten, reversiblen Terminatoren **177**, **178**, **179** und **180** ein Optimum der Einbauausbeute bei einer Reaktionszeit von 30 Minuten. Daher wurde diese Reaktionszeit in den folgenden Experimenten verwendet. Außerdem wurde auch gefunden, dass die Zugabe von  $\text{MnCl}_2$  die Reaktion der Polymerase an den oberflächen- gebundenen Templaten stark beschleunigt. Daher wurde dem Reaktionspuffer aus Kapitel 5.7.1 noch  $\text{MnCl}_2$  (1 mM) zugesetzt.

Die Durchführung der zweistufigen Primerverlängerung an immobilisierten Hairpin- Oligonukleotiden ist im Folgenden beschrieben:

- 1) **Blockierung der DNA-Träger:** Die Blockierung wurde durch zehnminütige Inkubation mit 50  $\mu\text{L}$  Blockierungslösung bestehend aus 33 mM Trisacetat pH = 7.9, 10 mM Magnesiumacetat, 66 mM Kaliumacetat, 1 mg/ml BSA, 10 mM DTT, 1 % Tween-20, 1 % NP-40 bei 37 °C durchgeführt.
- 2) **Erste Inkorporationsreaktion:** Der Träger wurde mit den Lösungen aller vier reversiblen Terminatoren **177**, **178**, **179** und **180** und der *RevertAid<sup>TM</sup> M-MuLV* reversen Transkriptase bei 37 °C für 30 Minuten inkubiert. Es wurden 35  $\mu\text{L}$  der Reaktionsmischung bestehend aus 33 mM Trisacetat pH = 7.9, 10 mM Magnesiumacetat, 66 mM Kaliumacetat, 0.1 mg/ml BSA, 1 mM  $\text{MnCl}_2$ , 10 mM DTT, 0.5 % Tween-20, 0.5 % Nonidet P-40, 1 % 2-Hydroxymethyl-18-crown-6,

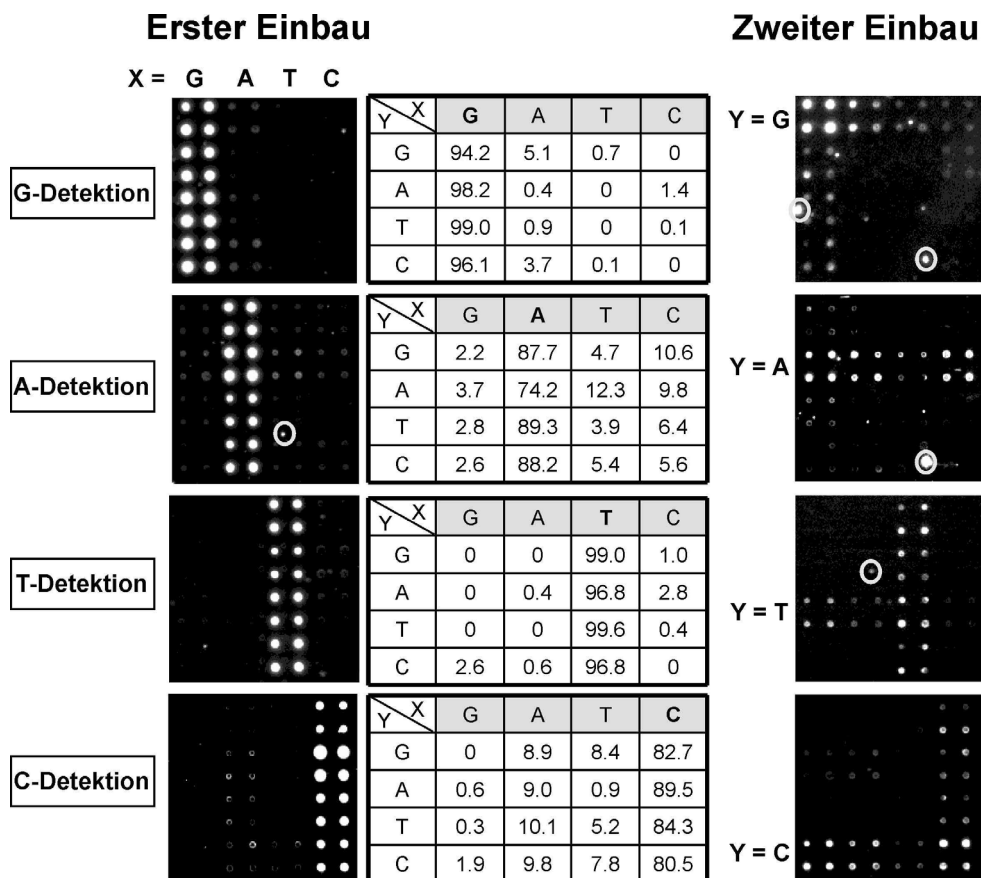
jeweils 100  $\mu\text{M}$  **177**, **178**, **179** und **180** und 10 U/ $\mu\text{L}$  *RevertAid<sup>TM</sup> M-MuLV* reverse Transkriptase verwendet.

- 3) **Blockierung der nicht verlängerten Oligonukleotide:** Die Blockierung erfolgte mit Terminal Desoxynukleotidyl Transferase (TdT) von *Fermentas* und ddATP durch 20minütige Inkubation des Trägers bei 37 °C. Es wurden 40  $\mu\text{L}$  der Reaktionslösung bestehend aus 200 mM Kaliumcacodylat, 25 mM Tris, 0.01 % Triton X-100, 1 mM  $\text{CoCl}_2$ , 1 mM ddATP und 80 U TdT verwendet. Die Blockierungsreaktion wurde durch Waschen mit 95 °C heißem, bidestilliertem Wasser gestoppt.
- 4) **Detektion der Fluoreszenzsignale:** Die Träger wurde getrocknet, mit einem Tropfen SlowFade Light Antifade Reagent (Molecular Probes) bedeckt und mittels eines *Genorama QuattroImager* Detektors und dem BaseCaller Modul des Genorama Genotyping Software Package analysiert.
- 5) **Abspaltung des Fluoreszenzfarbstoffs und der 3'-O-CE-Gruppe:** Vor der Behandlung mit 1 M TBAF-Lösung wurden die Träger dreimal mit trockenem THF gewaschen. Dann wurden sie für 15 Minuten bei 45 °C in einem Bad einer 1:1 Mischung aus 1 M TBAF-Lösung in THF und trockenem DMF inkubiert. Die Träger wurden anschließend mit bidestilliertem Wasser gewaschen, getrocknet und nochmals mit dem QuattroImager Detektor analysiert, um die Vollständigkeit der Farbstoffabspaltung zu überprüfen.
- 6) **Wiederholung des Blockierungsschritts 1:** Vor dem zweiten Inkorporationsschritt wurde der Blockierungsschritt des Trägers wiederholt (siehe Reaktionsschritt 1).
- 7) **Zweite Inkorporationsreaktion:** Die zweite Inkorporationsreaktion wurde unter den identischen Bedingungen wie die erste durchgeführt (siehe Reaktionsschritt 2). Die Reaktion wurde durch Waschen mit 95 °C heißem, bidestilliertem Wasser gestoppt.
- 8) **Detektion der Fluoreszenzsignale:** Der Träger wurde getrocknet und analysiert wie in Reaktionsschritt 4 beschrieben.

Die besten Ergebnisse in diesem zweistufigen Inkorporationsexperiment zeigten die Hairpin Oligonukleotide, die mit einer Konzentration von 10  $\mu\text{M}$  aufgetragen wurden. Daher sind die Ergebnisse dieser Bereiche in Form der aufgenommenen Fluoreszenzsignale des ersten und zweiten Einbauschriffs einer der beiden Anordnungen



und der numerischen Auswertung des ersten Einbauschritts beider 10  $\mu\text{M}$  Anordnungen in Abbildung 5-29 gezeigt.



**Abbildung 5-29:** Abbildung der aufgenommenen Fluoreszenzsignale für den ersten und zweiten Einbau und der numerischen Auswertung des ersten Einbauschritts der 10  $\mu\text{M}$  Proben. Eingekreiste Signale sind Artefakte.

Bei den Bildern des ersten bzw. zweiten Einbauschritts handelt es sich jeweils um die gleichen Anordnungen von Spots, die bei der Wellenlänge des entsprechenden Farbstoffs analysiert wurde. Die eingekreisten Signale sind Artefakte. Die Tabellen neben den jeweiligen Bildern entsprechen der numerischen Auswertung des ersten Einbauschritts und geben die Spezifität des Einbaus des jeweiligen Nukleotids an. Dabei sind die ausgelesenen Fluoreszenzkanäle grau hinterlegt und das jeweils in der Tabelle relevante Nukleotid fett dargestellt. Die Werte wurden aus beiden aufgetragenen 10  $\mu\text{M}$  Anordnungen ermittelt. Dabei wurden für die Berechnung jeder Zeile in den jeweiligen Tabellen die Signale derjenigen Primer berücksichtigt, die das interessierende Nukleotid im zweiten Schritt (Y) enthalten sollen. Diese Vorgehensweise ermöglicht die Bestimmung der Spezifität innerhalb des gleichen Sequenzzusammenhangs. So ergibt sich für die Inkorporation des Cy5-markierten, reversiblen

2'-Desoxyguanosin Terminators **179** in den Primer GG eine Spezifität von 94.2 %. Der höchste unspezifische Einbau von **179** mit 5.1 % wurde im Primer AG gefunden. Insgesamt wurde die höchste Spezifität für den Fluorescein-markierten, reversiblen 2'-Desoxyuridin Terminator **177** berechnet. Sie lag zwischen 96.8 % und 99.6 %. Für die beiden Fluoreszenz-markierten, reversiblen Terminatoren **180** und **178** wurden etwas geringere Spezifitäten von 74.2 % bis 89.3 % für **180** und 80.5 % bis 89.5 % für **178** beobachtet. Insgesamt ist das Ergebnis für den ersten Einbau sehr gut und bietet eine gute Grundlage für den zweiten Einbauschritt nach der Blockierung nicht verlängerter Primer mit TdT und der Abspaltung des Fluoreszenzfarbstoffs und der 3'-O-CE-Gruppe mit TBAF. Nach der Behandlung mit TBAF wurde der Träger erneut analysiert, um die vollständige Abspaltung der Fluoreszenzfarbstoffe zu überprüfen. Die Ergebnisse sind in Abbildung 5-29 nicht gezeigt, da nur das Hintergrundsignal detektiert werden konnte. Somit konnte sichergestellt werden, dass der Linker vollständig gespalten wurde. Der zweite Verlängerungsschritt wurde unter analogen Bedingungen wie der erst durchgeführt. Die Bilder des zweiten Einbaus in Abbildung 5-29 zeigen, dass eine zweite Verlängerung möglich ist. Es werden die erwarteten Signale in horizontaler Ausrichtung beobachtet. Allerdings sind zum einen noch weitere Signale zu sehen und zwar hauptsächlich die, die dem ersten Einbauschritt (vertikale Ausrichtung, vergleiche linke Bilder in Abbildung 5-29) entsprechen. Zum anderen ist die Fluoreszenzintensität im zweiten Schritt 15-30mal geringer als im Ersten.

Eine mögliche Erklärung für die geringere Spezifität wäre eine unvollständige Blockierung nach dem ersten Einbauschritt. Diese Vermutung wird gestützt durch die Tatsache, dass diese unspezifischen, dem ersten Einbauschritt entsprechenden Signale nicht im Fall der Primer beobachtet wurden, bei denen im ersten Einbauschritt ein 2'-Desoxyadenosin erwartet wurde (siehe zweites Bild auf der rechten Seite in Abbildung 5-29). Die Erklärung dafür könnte ein bevorzugter Einbau des ddATPs durch die TdT in die Primer sein, die 2'-Desoxythymidin im Templatstrang tragen. Des Weiteren könnten aber auch editierende Eigenschaften der TdT wie pyrophosphorolytische Dismutation<sup>[358]</sup> oder der Reversen Transkriptase wie Nukleotid abhängige Pyrophosphorolyse<sup>[296]</sup> zur Wiederherstellung der ursprünglichen Primer beitragen. Für die wesentlich geringere Intensität der Fluoreszenzsignale im zweiten Schritt könnte eine abnehmende Leistung der Polymerase aufgrund von Platzmangel zwischen dem

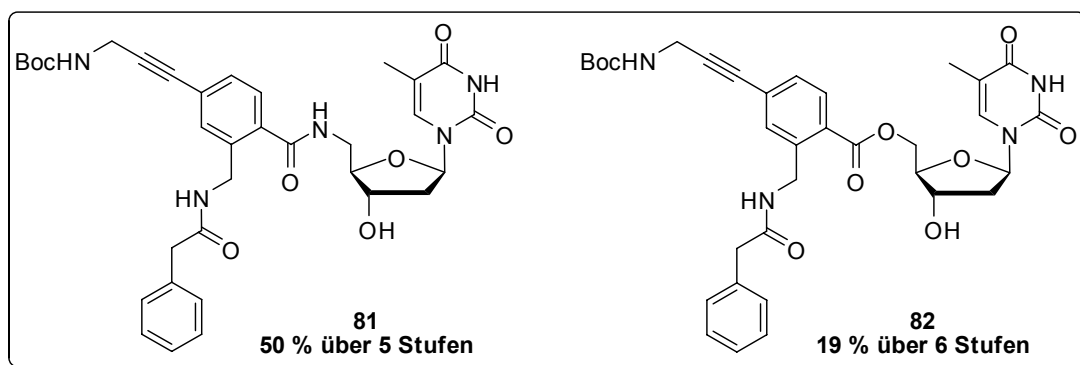
3'-Ende und der Trägeroberfläche oder die Anwesenheit der Propargylamingruppe ursächlich sein. Außerdem muss auch die unvollständige Deblockierung der 3'-Hydroxygruppe der reversiblen Terminatoren als problematisch in Betracht gezogen werden. Diese läuft auf der Trägeroberfläche möglicherweise weniger effizient ab, als in Lösung oder an dem CPG-immobilisierten Oligonukleotid **173**.<sup>[348,350]</sup>

Zwar wurden durch dieses erste Anwendungsbeispiel einige Probleme aufgedeckt, an deren Optimierung gearbeitet wird. Dennoch konnte demonstriert werden, dass die synthetisierten, Fluoreszenz-markierten, reversiblen Terminatoren **177**, **178**, **179** und **180** zusammen mit der ausgewählten reversen Transkriptase erfolgreich in einem ersten *Sequenzierung durch Synthese*-Ansatz eingesetzt werden konnten. Vor allem aber konnte gezeigt werden, dass der im Rahmen dieser Arbeit entwickelte Linker vollständig den Anforderungen für eine solche Anwendung entspricht.



## 6 Zusammenfassung und Ausblick

Das erste Ziel dieser Arbeit war die Entwicklung eines enzymatisch spaltbaren Safety-Catch-Linkers für die reversible Modifizierung von Antisense-Oligonukleotiden mit Transportermolekülen, um eine verbesserte und zielgerichtete Zellaufnahme zu erreichen. Der Safety-Catch-Linker sollte verschiedene variable Anbindungsstellen aufweisen, um die enzymatischen Substratgruppe und den Transporter gezielt auswählen zu können. Es wurden zunächst zwei mit Penicillin G Acylase spaltbare Linker **81** und **82** synthetisiert (Abbildung 6-1).



**Abbildung 6-1:** Synthetisierte Penicillin G Acylase spaltbare Safety-Catch-Linker **81** und **82**.

Im Zuge dessen wurde sowohl für die Möglichkeit der amidischen Anknüpfung an das Nukleosid als auch für die Esterverknüpfung die Synthese optimiert. Der Amid-verknüpfte Safety-Catch-Linker **81** konnte mit einer Gesamtausbeute von 50 % über fünf Stufen ausgehend von 5-Bromophthalid **80** und 5'-Amino-2'-desoxythymidin **77** hergestellt werden (siehe Kapitel 4.2.1). Der Ester-verknüpfte Safety-Catch-Linker **82** konnte ausgehend von 5-Bromophthalid **80** und 2'-Desoxythymidin **78** mit einer Gesamtausbeute von 19 % über sechs Stufen erhalten werden (siehe Kapitel 4.2.2).

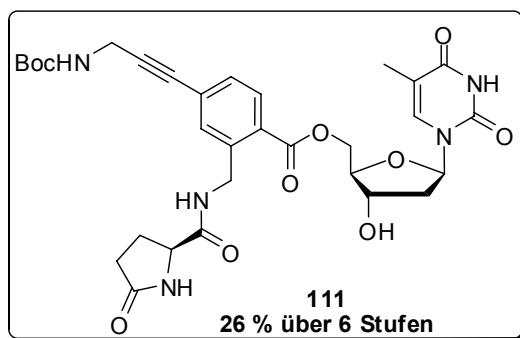
Nach der erfolgreichen Synthese stand die Untersuchung der Safety-Catch-Linker **81** und **82** hinsichtlich ihrer enzymatischen Spaltungs- und Stabilitätseigenschaften im Mittelpunkt. Es wurde eine Reihe von enzymatischen und nicht-enzymatischen Spaltungsversuchen durchgeführt.

Bei dem Amid-verknüpften Safety-Catch-Linker **81** konnte keine effektive Spaltung mit Penicillin G Acylase erreicht werden. Der Grund dafür ist die hohe Stabilität und damit

geringe Zyklisierungstendenz des nach der enzymatischen Spaltung vorliegenden, freien Amins. In einer Zyklisierungsuntersuchung bei verschiedenen Temperaturen konnte nachgewiesen werden, dass diese erst bei erhöhter Temperatur (60 °C) effektiv abläuft. So schied die Verwendung eines Amid-verknüpften Safety-Catch-Linkers für die hier geplante Anwendung unter physiologischen Bedingungen (37 °C) aus.

Die Untersuchung des entsprechenden Ester-verknüpften Derivats **82** hingegen zeigte die gewünschte, effektive enzymatische Spaltung und Zyklisierung bei 37 °C. Es konnte eindeutig nachgewiesen werden, dass der Safety-Catch-Linker **82** innerhalb von 25 Stunde bei 37 °C quantitativ durch das Enzym gespalten wird. Der entwickelte Ester-verknüpfte Safety-Catch-Linker ist also für die Variation des enzymatischen Substrats und gegebenenfalls Zellaufnahme- und Antisense-Experimente geeignet.

Im Rahmen einer Zusammenarbeit mit *Coley Pharmaceutical GmbH* bestand die Möglichkeit zur Durchführung von Zellaufnahmeuntersuchungen mit Transporter-modifizierten Antisense-Oligonukleotiden in Leberzellen. Als potentiell in Leberzellen spaltbarer Linker wurde der Pyroglutamyl Aminopeptidase I spaltbare Safety-Catch-Linker **111** synthetisiert (Abbildung 6-2).



**Abbildung 6-2:** Pyroglutamyl Aminopeptidase I spaltbarer Safety-Catch-Linker **111**.

Die Synthese des Safety-Catch-Linkers **111** erfolgte analog zu der des Ester-verknüpften, Penicillin G Acylase spaltbaren Linkers **82** und er konnte mit einer Gesamtausbeute von 26 % über sechs Stufen hergestellt werden. In einer Stabilitätsstudie zur Bestimmung des Ausmaßes der nicht-enzymatischen Spaltung in verschiedenen Puffersystemen wurde eine höhere Stabilität des Linkers **111** bei niedrigerem pH-Wert des Puffers gefunden.

Im Zuge dessen konnte außerdem der Mechanismus der nicht-enzymatischen Spaltung aufgeklärt werden, der bei den beiden Ester-verknüpften Safety-Catch-Linkern **82** und

**111** unter bestimmten Bedingungen beobachtet wurde. Er beruht auf einem, verglichen mit der enzymatischen Spaltung, in umgekehrter Reihenfolge verlaufenden Mechanismus. Der erste Schritt ist hier der intramolekulare Angriff der Amidfunktion an die Carbonylgruppe des Esters unter Freisetzung von 2'-Desoxythymidin **78**. Der zweite Schritt ist die Hydrolyse der Amidbindung des Enzymsubstrats, die damit das aromatische Lactam **107** liefert.

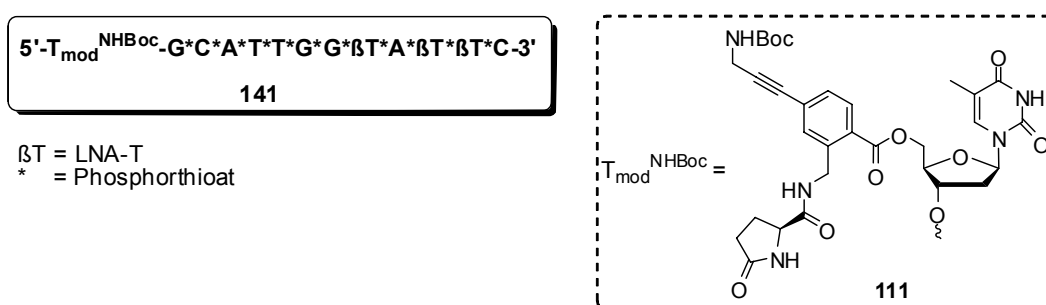
Mit dem Safety-Catch-Linker **111** wurden anschließend kinetische Untersuchungen zu der Spaltung mit Pyroglutamyl Aminopeptidase I durchgeführt. Dazu wurden zum einen die optimierten Pufferbedingungen (pH = 6.5), bei denen die nicht-enzymatische Spaltung keine Rolle spielt und zum Vergleich Bedingungen unter physiologischem pH-Wert (7.4) untersucht. Es wurde in beiden Fällen eine sehr schnelle, quantitative Umsetzung des Substrats **111** innerhalb einer Stunde beobachtet. Bei pH = 7.4 verlief diese Umsetzung direkt zu dem Zyklisierungsprodukt **107** und das intermediäre freie Amin **119** wurde kaum detektiert. Bei pH = 6.5 hingegen verlief die Spaltung über das freie Amin **119** als tatsächliches Zwischenprodukt, dass über acht Stunden hinweg in der RP-HPLC detektiert wurde.

Daraus konnten folgende Schlussfolgerungen gezogen werden:

- 1) Der Safety-Catch-Linker **111** ist ein sehr gutes Substrat für die Pyroglutamyl Aminopeptidase I.
- 2) Die Geschwindigkeit der enzymatischen Spaltung des Safety-Catch-Linkers **111** ist im untersuchten Bereich vom pH-Wert unabhängig.
- 3) Der Reaktionsverlauf der enzymatischen Spaltung bei pH = 7.4 entspricht einer Folgerreaktion unter quasistationären Bedingungen. Das heißt die enzymatische Spaltung ist der geschwindigkeitsbestimmende Schritt und die Konzentration des Zwischenprodukts ist vernachlässigbar.
- 4) Der Reaktionsverlauf der enzymatischen Spaltung bei pH = 6.5 entspricht einer typischen Folgereaktion, die Konzentration des Zwischenprodukts **119** erreicht nach einer Stunde ihr Maximum. Hier ist die intramolekulare Zyklisierung des Zwischenprodukts **119** der geschwindigkeitsbestimmende Schritt.

Für die Herstellung eines Taurocholsäure-gekoppelten Antisense-Oligonukleotids wurde der Pyroglutamyl Aminopeptidase I spaltbare Safety-Catch-Linker **111** erfolgreich in sein 3'-Phosphoramidit überführt. Die Sequenz des 12mer Antisense-

Oligonukleotids, dass in einem Apolipoprotein B „knockdown“ Hep3B Zellassay bei *Coley Pharmaceutical GmbH* eingesetzt werden sollte wurde durch *Dr. Eugen Uhlmann* evaluiert. Da der Safety-Catch-Linker **111** sehr basenlabil ist, wurde eine neue, von *Sekine et al.* entwickelte Methode zur schutzgruppenfreien Oligonukleotidsynthese erstmals im Arbeitskreis von *Prof. Engels* erfolgreich angewendet. Der Safety-Catch-Linker **111** konnte erfolgreich in das Antisense-Oligonukleotid **141** eingebaut werden (Abbildung 6-3).



**Abbildung 6-3:** Hergestelltes Antisense-Oligonukleotid **141** mit dem Pyroglutamyl Amino-peptidase I spaltbaren Safety-Catch-Linker.

Das *N*-Boc-geschütztes Oligonukleotid **141** konnte mit einer guten Ausbeute von 23 % erhalten werden. Es war allerdings hier nicht möglich die *N*-Boc-Schutzgruppe mit 3 %iger TCA-Lösung von dem Propargylaminspacer abzuspalten. Dies war sehr überraschend, da diese Vorgehensweise der *N*-Boc-Entschützung an CPG-gebundenen Oligonukleotiden bereits an vielen Beispielen im Arbeitskreis von *Prof. Engels* angewendet und veröffentlicht wurde, unter anderem auch am Beispiel des im Rahmen dieser Arbeit entwickelten Fluorid-spaltbaren Linkers.<sup>[334,335,348]</sup> Daher konnte das Antisense-Oligonukleotid nicht mit dem Taurocholsäuretransporter modifiziert werden. Da die Synthese des modifizierten Oligonukleotids mit der schutzgruppenfreien Methode aber erfolgreich durchgeführt werden konnte, sollte ein Wechsel der Aminoschutzgruppe die Herstellung des Taurocholsäurekonjugats ermöglichen.

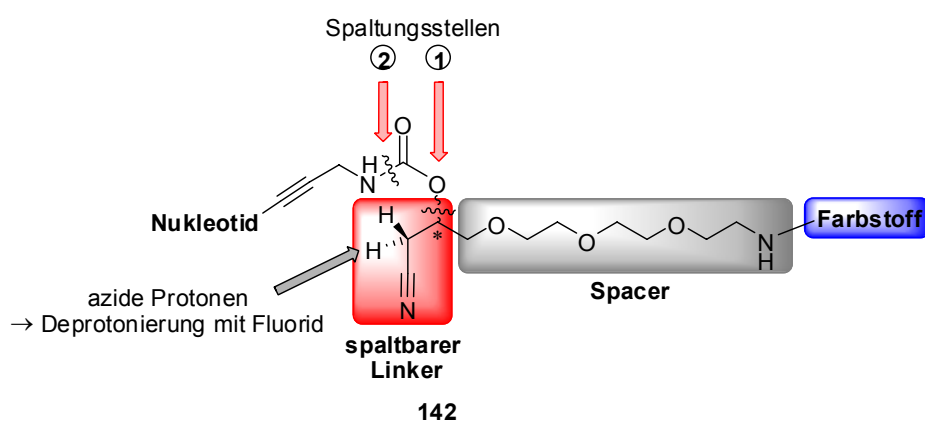
Es konnte im Rahmen dieser Arbeit ein variabler enzymatisch spaltbarer Safety-Catch-Linker entwickelt werden. Es wurden drei verschiedene neue Linker **81**, **82** und **111** synthetisiert, die Substrate für zwei unterschiedliche Enzyme sind. Die Spaltungs- und Stabilitätseigenschaften aller drei Linker wurden intensiv untersucht und es konnte gezeigt werden, dass die Ester-verknüpften Linker für eine Anwendung unter physiologischen Bedingungen geeignet sind. Darüber hinaus konnte der sehr basenlabile Safety-Catch-Linker **111** unter Anwendung einer schutzgruppenfreien



Oligonukleotidsynthesemethode<sup>[329]</sup> erfolgreich in ein Antisense-Oligonukleotid eingebaut werden.

Für die zukünftige Verwendung des Safety-Catch-Linkers zur reversiblen Modifikation von Oligonukleotiden, um deren zielgerichtete Zellaufnahme zu verbessern, muss die Schutzgruppenstrategie am Propargylaminspacer des Linkers geändert werden. Eine gut handhabbare und trotzdem sehr säurelabile Aminoschutzgruppe, deren Verwendung für zukünftige Oligonukleotid- bzw. Konjugatsynthesen empfohlen wird, ist die Monomethoxytritylgruppe (MMTr).

Die Bearbeitung des zweiten Themas dieser Arbeit fand im Rahmen des EU-Projekts „ArraySBS“ statt. Aufgabe des Teilprojekts des Arbeitskreises von *Prof. Engels* war die Entwicklung von vier neuen, reversiblen Terminatoren für den Einsatz in einem *Sequenzierung durch Synthese*-Ansatz. Das Ziel dieser Arbeit war dabei die Entwicklung eines Fluorid-spaltbaren Linkers zur Fluoreszenzmarkierung der reversiblen Terminatoren sowie die Synthese der vier Fluoreszenz-markierten, reversiblen Terminatoren. Die Anforderungen an den Linker sind neben der effektiven Fluoridsplattbarkeit Anknüpfungspunkte für das Nukleotid und den Fluoreszenzfarbstoff. Daraus wurde der in Abbildung 6-4 gezeigte Linker **142** entwickelt.

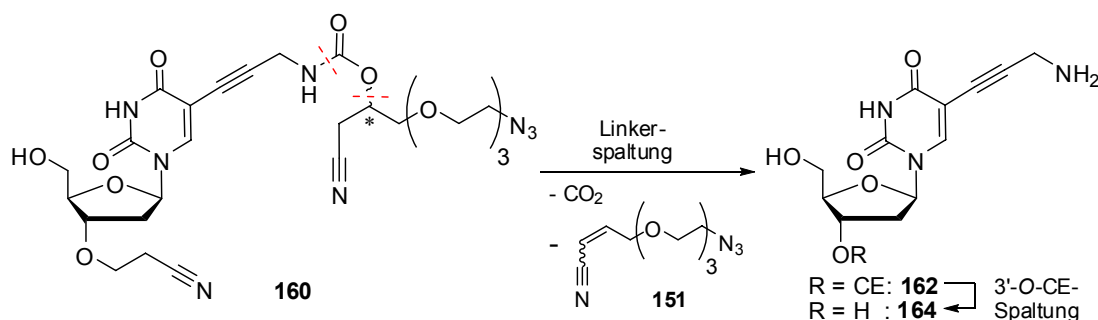


**Abbildung 6-4:** Struktur des Fluorid-spaltbaren Linkers **142**.

Die Spaltung sollte dabei in zwei Stufen durch Fluorid-vermittelte Deprotonierung der Aziden, vicinal zur Nitrilgruppe stehenden Protonen und anschließend, durch die  $\beta$ -Eliminierung initiiertem Zerfall der Carbamateinheit unter Abspaltung von Kohlendioxid und Freisetzung des Nukleotids erfolgen.

Zur Evaluierung der Spaltungseigenschaften und des Spaltungsmechanismus des Fluorid-spaltbaren Linkers wurde eine Modellverbindung **147** (siehe Kapitel 5.2) und ein erstes 3'-O-CE- und Linker-modifizierten Nukleosids **160** (siehe Kapitel 5.4) synthetisiert und untersucht.

Bei den Spaltungsversuchen mit der Modellverbindung wurde eine sehr effektive Spaltung des Linkers mit 1 M TBAF-Lösung in THF gefunden. Bei Raumtemperatur ist die Spaltung in weniger als einer Minute quantitativ. Die Untersuchungen bestätigten außerdem den vermuteten  $\beta$ -Eliminierungsmechanismus, weshalb die sehr schnelle Spaltung auf die Freisetzung des Kohlendioxids als Triebkraft zurückgeführt wird. Mit dem modifizierten Nukleosid **160** konnte die sehr effektive Spaltung des Linkers auch am Beispiel eines Nukleosids bestätigt werden. Außerdem konnten hier das erste Mal die Spaltung des Linkers und der ausgewählten 3'-Schutzgruppe für die reversiblen Terminatoren verglichen werden (Schema 6-1).

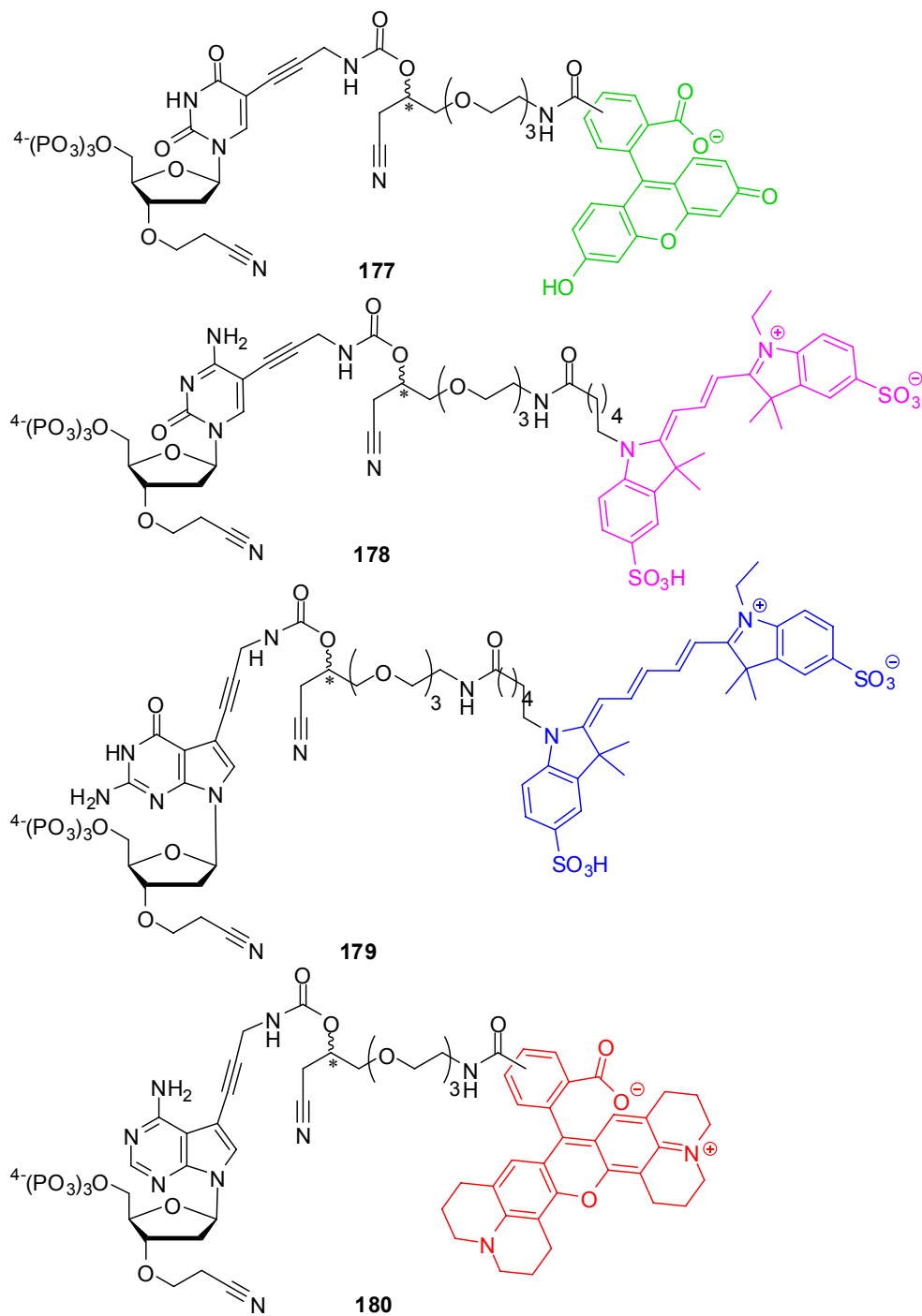


**Schema 6-1:** Zweistufige Spaltung des modifizierten Nukleosids **160** mit 1 M TBAF.

Es wurde erwartungsgemäß eine zweistufige Spaltung gefunden. Der Linker wurde auch von dem Nukleosid in weniger als einer Minute quantitativ gespalten, während die 3'-Hydroxygruppe bei Raumtemperatur erst nach zwei Stunden vollständig entschützt war. Die Spaltungsbedingungen konnten außerdem erfolgreich auf die Entschützung eines an CPG immobilisierten, 3'-O-CE- und Linker/Fluorescein-modifizierten Oligonukleotids übertragen werden (siehe Kapitel 5.5).

Durch diese Experimente konnte gezeigt werden, dass der entwickelte Linker **142** sehr gut für den Einsatz zur reversiblen Fluoreszenzmarkierung von reversiblen Terminatoren geeignet ist.

Ausgehend von den bereits 3'-O-CE-modifizierten Iodonukleosiden<sup>[298]</sup> wurden dann die vier in Abbildung 6-5 gezeigten Fluoreszenz-markierten, reversiblen Terminatoren **177**, **178**, **179** und **180** synthetisiert.



**Abbildung 6-5:** Synthetisierte, Fluoreszenz-markierte, reversible Terminatoren **177**, **178**, **179** und **180**.

Alle vier Fluoreszenz-markierten, reversiblen Terminatoren **177**, **178**, **179** und **180** konnten erfolgreich und in sehr hoher Reinheit hergestellt werden. Sie wurden anschließend zu ersten Inkorporations- und Anwendungstests durch die Kooperationspartner bei *Asper Biotech* und *Fermentas UAB* eingesetzt. Dabei wurden sie zunächst auf ihre Akzeptanz durch die optimierte DNA-Polymerase getestet. Es

zeigte sich, dass alle vier Fluoreszenz-markierten, reversiblen Terminatoren durch die *RevertAid<sup>TM</sup> M-MuLV* Reverse Transkriptase in DNA-Template eingebaut werden. Es konnte dann eine erste zweistufige Primerverlängerung an immobilisierten Hairpin-Templaten erfolgreich durchgeführt werden. Vor allem in der ersten Verlängerungsreaktion zeigte sich, dass die Fluoreszenz-markierten, reversiblen Terminatoren **177**, **178**, **179** und **180** mit großer Selektivität in die entsprechenden Primer eingebaut wurden. Auch die Entfernung des Fluoreszenz-Farbstoffs durch die Spaltung des entwickelten Linkers mit 1 M TBAF verlief an den immobilisierten Templaten optimal. Trotzdem zeigten sich im zweiten Schritt der Primerverlängerung eine deutlich verringert Selektivität und Fluoreszenzintensität. Die Verbesserung dieses zweiten Schritts und damit auch die Ermöglichung weiterer Einbauzyklen ist zurzeit in Bearbeitung.

Es konnte im Rahmen dieser Arbeit ein neuer, hoch effizient Fluorid-spaltbarer Linker entwickelt werden. Die Spaltungseigenschaften wurden an einer Modellverbindung, einem modifizierten Nukleosid und einem immobilisierten Oligonukleotid intensiv untersucht. Es wurden mit Hilfe des entwickelten Linkers vier neue, Fluoreszenz-markierte, reversible Terminatoren **177**, **178**, **179** und **180** in sehr hoher Reinheit hergestellt und analytisch eindeutig identifiziert. Diese reversiblen Terminatoren wurden dann im Rahmen des EU-Projekts „ArraySBS“ erfolgreich durch eine DNA-Polymerase in DNA-Template eingebaut und in einem ersten, zweistufigen Anwendungstest an immobilisierten Hairpin-Templaten erfolgreichen eingesetzt.

Der Linker bietet neben der Anbindung eines Fluoreszenzfarbstoffs über die gezeigte Amidbindung auch die Möglichkeit Markierungen über die Azidfunktion in einer „Click“-Reaktion anzuknüpfen. Erste Beispiele dafür wurden ebenfalls im Rahmen dieser Arbeit hergestellt und veröffentlicht<sup>[348]</sup> (Abbildung 6-6).





# 7 Experimenteller Teil

## 7.1 Allgemeine Informationen und Methoden

Es wurden die folgenden Chemikalien, Geräte und Methoden verwendet:

### **Edukte, Reagenzien und Lösungsmittel:**

Es wurden Edukte und Reagenzien von verschiedenen Anbietern (Acros Organics, Sigma-Aldrich, Fluka, Riedel-de-Haen, Merck, ABCR, Grüssing, Roth, Fisher Scientific, Janssen Chimica, Alfa Aesar, Invitrogen, Lancaster, GE Healthcare, Waldhof Pharma, Bachem, Takara) verwendet und in den meisten Fällen direkt eingesetzt oder vor der Benutzung nach Standardvorschriften gereinigt bzw. getrocknet.<sup>[359]</sup>

Natriumhydrid wurde vor Gebrauch durch dreimaliges Waschen mit THF unter Schutzgas von Mineralöl befreit und anschließend im Hochvakuum getrocknet. Die so erhaltene Masse an Hydrid wurde über Differenzwägung des Kolbens bestimmt.

Zur Chromatographie verwendete Lösungsmittel wurden entweder in p.a. bzw. HPLC Qualität gekauft (Acetonitril, Chloroform) oder in technischer Qualität als Kanisterware an der Universität bezogen. Die Kanisterware wurde zuvor durch Destillation gereinigt, Dichlormethan wurde von  $\text{CaCl}_2$ , Methanol von  $\text{CaO}$ , Ethylacetat von  $\text{K}_2\text{CO}_3$  und *n*Hexan von Molsieb abdestilliert.

Lösungsmittel zur Synthese bzw. wasserfreie Lösungsmittel wurden in p.a. Qualität bzw. über Molsieb (Fluka) erworben.

### **Arbeitsmethoden:**

Versuche unter inerten Arbeitsbedingungen wurden in Schlenk-Apparaturen durchgeführt, die mit Hilfe einer Ölpumpe evakuiert, durch Erhitzen mit einem Heißluftfön (King Craft GT-HAG-01, 2000 W) von anhaftendem Wasser befreit und nach Abkühlen auf Raumtemperatur mit Schutzgas (Argon, Reinheit  $\geq 99.999\%$ ) belüftet wurden. Im Fall der Verwendung von größeren Apparaturen oder Rückflusskühlern wurde die gesamte Apparatur 24 Stunden bei  $120\text{ }^\circ\text{C}$  gelagert, heiß aufgebaut und mit Hilfe einer Ölpumpe evakuiert. Nach Abkühlen auf Raumtemperatur wurde dann mit Schutzgas belüftet.

**Dünnschichtchromatographie (DC):** Für die analytische DC wurden Kieselgel-beschichtete Plastikfertigplatten (Polygram® Sil G/UV<sub>254</sub>, Schichtdicke 0.2 mm) der Firma Machery-Nagel bzw. Aluminiumfertigplatten (DC Kieselgel 60 F<sub>254</sub>, Schichtdicke 0.2 mm) der Firma Merck verwendet. Für analytische Umkehrphasen(RP)-DC wurden beschichtete Aluminiumfertigplatten (DC-Alufolien-Nano-Kieselgel RP-18 W, Schichtdicke 0.15 mm) mit Fluoreszenz Indikator 254 nm der Firma Sigma-Aldrich verwendet. Die Chromatogramme wurden in Kammersättigung aufgenommen und die R<sub>F</sub>-Werte ermittelt. UV-aktive Substanzen wurden bei einer Wellenlänge von 254 nm detektiert, Fluoreszenz-aktive Substanzen bei 366 nm, zusätzlich wurden die Chromatogramme bei Bedarf mittels 1 %iger wässriger Kaliumpermanganatlösung oder 0.5 %iger 2-propanolischer Ninhydrinlösung (Acros Organics) und Erhitzen mit einem Heißluftfön (King Craft GT-HAG-01, 2000 W) entwickelt. UV-inaktive Substanzen wurden ebenfalls mit Hilfe von Kaliumpermanganat- oder Ninhydrinlösung untersucht.

**Flash-Säulenchromatographie:** Die Apparaturen wurden von der Firma Glasgerätebau Ochs bezogen. Als stationäre Phase wurde Kieselgel 60 (Korngröße: 15-40 µm) der Firma Merck verwendet, dass zuvor durch spülen mit Methanol, Essigester, *n*Hexan/Diethylether und *n*Hexan konditioniert wurde. Die Trennungen wurden bei einem Druck von 2-3 bar durchgeführt.

**Kieselgelfritte:** Zur groben Aufreinigung von Rohprodukten oder zur Reinigung von großen Mengen, bei denen kein Trennproblem vorlag, wurden Kieselgelfritten verwendet. Hierzu wurden Glasfritten (Porengröße: D3) mit Kieselgel 60 (Korngröße: 40-65 µm) der Firma Machery-Nagel gefüllt, das Kieselgel wurde analog der Flash-Säulenchromatographie vor Gebrauch konditioniert. Der Lösungsmittelfluss wurde durch Anlegen eines Membranpumpenvakuums gesteuert.

**Kernresonanzspektroskopie (NMR):** Für die Aufnahme von <sup>1</sup>H-NMR, <sup>13</sup>C-NMR und <sup>31</sup>P-NMR Spektren wurden AM250, DPX250, AV300, AV400, AV600 und AV800 Geräte verwendet. Alle Spektren wurden bei 300 K aufgenommen. Die chemischen Verschiebungen (δ) der <sup>1</sup>H-NMR und breitbandentkoppelten <sup>13</sup>C-NMR Signale sind in ppm, relativ zum Signal des verwendeten Lösungsmittel (CDCl<sub>3</sub>: δ<sub>CHCl<sub>3</sub></sub> = 7.26 ppm, δ<sub>CDCl<sub>3</sub></sub> = 77.16 ppm, DMSO: δ<sub>DMSO-*HD*5</sub> = 2.50 ppm, δ<sub>DMSO-*C*</sub> = 39.52 ppm, D<sub>2</sub>O: δ<sub>HDO</sub> = 4.69 ppm, (CD<sub>3</sub>)<sub>2</sub>CO: δ<sub>CD<sub>3</sub>CHD<sub>2</sub>CO</sub> = 2.05 ppm, δ<sub>(CD<sub>3</sub>)<sub>2</sub>CO</sub> = 29.84 ppm) angegeben. Bei den <sup>13</sup>C-NMR Spektren der Triphosphate in D<sub>2</sub>O wurde auf das im



Puffer enthaltene Triethylamin kalibriert. Die chemischen Verschiebungen ( $\delta$ ) in ppm von  $^{31}\text{P}$ -NMR Signalen werden gegen einen externen Standard von 85 %iger Phosphorsäure angegeben. Die Feinstruktur der Signale ist als s (Singulett), d (Dublett), t (Triplett), q (Quartett), m (Multiplett), dd (Doppeldublett) usw. angegeben. Pseudomultiplizitäten werden in Anführungsstriche gesetzt. Zur Zuordnung der  $^1\text{H}$ -NMR und  $^{13}\text{C}$ -NMR Signale wurden DEPT- und 2D-Experimente zu Hilfe genommen. Ist die Zuordnung der  $^{13}\text{C}$ -Signale nicht möglich, sind die beobachteten Signale aufgelistet.

**Massenspektroskopie (MS):** ESI-Massenspektren wurde an einem Gerät der Firma Fisons mit einer VG Plattform II mit Quadrupol Analysator aufgenommen. MALDI-Massenspektroskopie wurde an einem VG TOFSpec der Firma Fisons durchgeführt mit 2,5-Dihydroxybenzoesäure als Matrix für kleine Moleküle und 6-Aza-2-thiothymine/Ammoniumcitrat/Norharman als Matrix für Oligonukleotide.

**Fouriertransformations-Infrarotspektroskopie (FT-IR)** wurde an einem 1600 series FT-IR Instrument der Firma Perkin Elmer durchgeführt. Die Intensitäten der Signale wurden mit „s“ für stark und „m“ für medium abgekürzt.

**UV-Spektren** wurden an einem Jasco V-650 Spektrometer in 1 cm Quarzglasküvetten aufgenommen.

**Fluoreszenzspektren** wurden mit einem Hitachi F4500 Fluoreszenz Spektrometer in 0.3 cm Küvetten aufgenommen.

**Elementaranalyse (EA):** Die Analysen wurden von März 2006 bis Mitte Februar 2009 an einem Gerät der Firma Foss-Heraeus (CHN-O Rapid) gemessen und ab Mitte Februar 2009 an einem Elementar vario MACRO cube.

**Schmelzpunkte** wurden an einem Buechi 510 Gerät nach der Methode von Tottoli bestimmt und sind unkorrigiert.

Zur **Synthese von Oligonukleotiden** wurde ein Expedite 8905 Nucleic Acid Synthesizer von PerSeptive Biosystems verwendet.

Zum **Einengen empfindlicher Proben** wurde eine **Lyophilie** des Typs LDC-1 der Firma Christ verwendet oder **SpeedVacs** der Typen SC110 der Firma Savant bzw. Alpha RVC der Firma Christ.

Zur **Einstellung des pH-Werts** wurde ein Gerät der Firma Knick (761 Calimatic) verwendet.

**Mikrowellensynthese:** Es wurde ein Gerät der Firma CEM, Modell Discover verwendet.

**Darstellung der NMR-Daten:** Um die Zuordnung der NMR-Daten übersichtlich zu gestalten, wurde nicht die IUPAC-Nummerierung verwendet, sondern die Kohlenstoffatome der Reihe nach durchnummeriert. Diese Durchnummerierung steht nicht in Verbindung mit der Nummerierung, die dem Namen der Verbindung zugrunde liegt und wird ausschließlich im Experimentellen Teil verwendet.

### **7.1.1 Reinigung der Triphosphate und Oligonukleotide durch Ionenaustausch(IA) bzw. Umkehrphasen(RP)-Chromatographie an einem FPLC System**

Es wurde ein FPLC<sup>®</sup> (Fast Protein Liquid Chromatography) System der Firma Pharmacia verwendet, ausgestattet mit der Kontrolleinheit Liquid Chromatography Controller LCC-500 Plus, zwei Pumpen High (Precision Pump P-500), einem Rekorder (Rec-482) und einem UV-Monitor (Single Path Monitor UV-1). Die Absorption wurde bei 254 nm gemessen, es wurde je nach Bedarf entweder eine 10 mm Flusszelle (HR 10) oder eine 2 mm Flusszelle (S-2) verwendet, die Proben wurden mit einer peristaltischen Pumpe (Peristaltic Pump P-1) aufgetragen, Fraktionen wurden mit dem Fraktionssammler (RediFrac) abgenommen. Es kamen selbst gepackte Säulen verschiedener Größen zum Einsatz. Zur IA-Chromatographie wurde DEAE Sepharose<sup>®</sup> Material von Sigma-Aldrich mit selbst hergestellte Triethylammoniumbicarbonat (TEAB)-Pufferlösung pH = 8.0 in verschiedenen Konzentrationen verwendet. Zur RP-Chromatographie wurde Octadecyl-funktionalisiertes Kieselgel der Firma Sigma-Aldrich mit Acetonitril/Millipore Wasser Gemischen als Eluent verwendet.

Für die IA-Chromatographie wurden die Triphosphate in Millipore Wasser (7 mL bis 15 mL) aufgenommen und unlösliche Bestandteile mittels eines 0.45 µm Spritzenfilters abgetrennt. Es wurden die folgenden Gradienten zur Aufreinigung verwendet:

**Ionenaustausch-FPLC:**

<b>IA-FPLC1 (4 mL/Min.)</b>			
Volumen [mL]	0	500	650
% A (0.05 M TEAB-Puffer, pH = 8)	100	50	0
% B (0.8 M TEAB-Puffer, pH = 8)	0	50	100
<b>IA-FPLC2 (4 mL/Min.)</b>			
Volumen [mL]	0	500	650
% A (0.05 M TEAB-Puffer, pH = 8)	100	50	0
% B (0.7 M TEAB-Puffer, pH = 8)	0	50	100
<b>IA-FPLC3 (4 mL/Min.)</b>			
Volumen [mL]	0	500	650
% A (Millipore Wasser)	100	50	0
% B (0.3 M TEAB-Puffer, pH = 8)	0	50	100

**Umkehrphasen-FPLC:**

RP-FPLC1 (3 mL/Min.)								
Volumen [mL]	0	60	120	160	220	250	280	310
% A (Millipore Wasser)	100	99	95	90	80	50	0	0
% B (Acetonitril)	0	1	5	10	20	50	100	100
RP-FPLC2 (4 mL/Min.)								
Volumen [mL]	0			450		550		560
% A (Millipore Wasser)	100			90		0		100
% B (Acetonitril)	0			10		100		0
RP-FPLC3 (4 mL/Min.)								
Volumen [mL]	0			250		350		450
% A (Millipore Wasser)	99			75		50		0
% B (Acetonitril)	1			25		50		100

**Herstellung des TEAB-Puffers:**

In einer 2 L Vorratsflasche mit Gaseinleitungsrohr werden 278 mL Triethylamin und 722 mL demineralisiertes Wasser gemischt und unter starkem Rühren CO<sub>2</sub> eingeleitet. Dabei wird die Mischung homogen. Es wird so lange weiter CO<sub>2</sub> eingeleitet, bis der pH-Wert der Lösung 8.0 beträgt. Die Lösung muss sofort verwendet werden oder der pH-Wert vor der Verwendung überprüft und gegebenenfalls neu eingestellt werden, da er sich durch Ausgasen von CO<sub>2</sub> erhöht.

### 7.1.2 Reinigung der Triphosphate und Oligonukleotide durch IA- bzw. RP-HPLC und Analyse der Stabilitäts- und Spaltungstests durch analytische RP-HPLC

#### Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (HPLC):

Umkehrphasen(RP)-HPLC wurde an einem Jasco LC-2000Plus HPLC System mit einem Jasco UV 2075Plus Detektor (Detektion bei 254 nm oder 265 nm) und einem Shimadzu RF-353 Fluoreszenz Detektor (Anregungs- und Emissionswellenlänge abhängig vom verwendeten Farbstoff). Es wurden Phenomenex Jupiter 4 $\mu$  Proteo 90 Å Säulen verschiedener Größe verwendet (250x15 mm für präparative und 250x4.6 mm für analytische Trennungen) mit 1 M Triethylammoniumacetat(TEAA)-Puffer pH = 6.5/Millipore Wasser/ Acetonitril Gemischen als Eluent. Ionenaustausch(IA)-HPLC wurde an einem Jasco LC-900 HPLC System mit Jasco UV-970 Detektor (Detektion bei 254 nm) durchgeführt. Es wurde eine Dionex BioLC<sup>®</sup> DNAPac<sup>®</sup> PA-100 (250x9 mm) Säule mit Gemischen aus Millipore Wasser/0.25 M Tris(hydroxymethyl)-aminomethan Hydrochlorid(Tris-Cl)-Puffer pH = 8/1 M Natriumchloridlösung als Eluent.

Die durch IA- oder RP-FPLC vorgereinigten Triphosphate wurden in 1 mL bis 2 mL Millipore Wasser gelöst und noch mal mittels eines Spritzenfilters (0.45  $\mu$ m) von Schwebstoffen befreit.

Die Oligonukleotide wurden in 1 mL Millipore Wasser gelöst und ohne Filtration auf die HPLC aufgebracht.

Es wurden die folgenden Methoden zur Aufreinigung der Triphosphate und Oligonukleotide und zur Analyse der Proben aus den Spaltungs- und Stabilitätsexperimenten verwendet.

IA-HPLC1 (5 mL/Min.), 254 nm						
Zeit [Min.]	0	20	23	25	27	30
% A	85	65	0	0	85	85
% B	10	10	0	0	10	10
% C	5	25	100	100	5	5

A: Millipore Wasser, B:0.25 M Tris(hydroxymethyl)aminomethan Hydrochlorid(Tris-Cl)-Puffer pH = 8, C: 1 M Natriumchloridlösung.

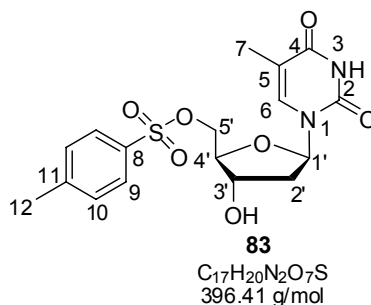
RP-HPLC1 (6 mL/Min.), 254 nm						
Zeit [Min.]	0	15	16	22	23	30
% A	10	10	0	0	10	10
% B	90	53	0	0	90	90
% C	0	37	100	100	0	0
RP-HPLC2 (6 mL/Min.), 254 nm						
Zeit [Min.]	0	15	16	22	23	30
% A	10	10	0	0	10	10
% B	90	60	0	0	90	90
% C	0	30	100	100	0	0
RP-HPLC3 (6 mL/Min.), 254 nm						
Zeit [Min.]	0	18	18.5	26.5	27	30
% A	10	10	0	0	10	10
% B	90	54	0	0	90	90
% C	0	36	100	100	0	0
RP-HPLC4 (6 mL/Min.), 254 nm						
Zeit [Min.]	0	22	23	27	30	
% A	10	10	0	0	10	
% B	70	15	0	0	70	
% C	20	75	100	100	20	
RP-HPLC5 (7 mL/Min.), 254 nm						
Zeit [Min.]	0	21	22	26	27	30
% A	10	10	0	0	10	10
% B	90	50	0	0	90	90
% C	0	40	100	100	0	0
RP-HPLC6 (1 mL/Min.), 254 nm						
Zeit [Min.]	0	22	23	27	30	
% A	10	10	0	0	10	
% B	70	15	0	0	70	
% C	20	75	100	100	20	
RP-HPLC7 (1 mL/Min.), 254 nm						
Zeit [Min.]	0	22	23	27	30	
% A	10	10	0	0	10	
% B	70	35	0	0	70	
% C	20	55	100	100	20	
RP-HPLC8 (1 mL/Min.), 254 nm						
Zeit [Min.]	0	22	23	27	30	
% A	10	10	0	0	10	
% B	80	45	0	0	80	
% C	10	45	100	100	10	

RP-HPLC9 (1 mL/Min.), 254 nm						
Zeit [Min.]	0	23	24	29	30	35
% A	10	10	0	0	10	10
% B	80	45	5	5	80	80
% C	10	45	95	95	10	10
RP-HPLC10 (1 mL/Min.), 265 nm						
Zeit [Min.]	0	23	24	29	30	35
% A	10	10	0	0	10	10
% B	80	45	5	5	80	80
% C	10	45	95	95	10	10
RP-HPLC11 (1 mL/Min.), 254 nm						
Zeit [Min.]	0	10	14	20		
% A	10	10	10	10		
% B	70	15	0	70		
% C	20	75	90	20		
RP-HPLC12 (1 mL/Min.), 254 nm						
Zeit [Min.]	0	20	25	30		
% A	10	10	10	10		
% B	90	60	0	90		
% C	0	30	90	0		

A: 1 M Triethylammoniumacetat(TEAA)-Puffer pH = 6.5, B: Millipore Wasser, C: Acetonitril.

## 7.2 Herstellung des Amid-verknüpften, enzymatisch spaltbaren Safety-Catch-Linkers 81

### 7.2.1 Herstellung von 5'-O-Tosyl-2'-desoxythymidin 83



Entsprechend der Literaturvorschrift<sup>[339]</sup> werden 25.0 g 2'-Desoxythymidin **78** (103.2 mmol, 1.0 Äq.) zweimal mit 100 mL trockenem Pyridin coevaporiert und über Nacht im Vakuum getrocknet. Unter inerten Bedingungen wird das getrocknete Edukt **78** dann in 200 mL trockenem Pyridin gelöst und auf -20 °C gekühlt. 21.9 g Tosylchlorid (113.5 mmol, 1.1 Äq.) werden in 80 mL trockenem Dichlormethan gelöst und mittels eines Tropftrichters innerhalb von zwei Stunden zugetropft. Es wird fünf Stunden bei -20 °C und 16 Stunden bei 0 °C gerührt bevor die Reaktion durch Zugabe von 150 mL Methanol beendet wird. Das Lösungsmittel wird im Vakuum entfernt und der Rückstand in 250 mL Dichlormethan aufgenommen. Die organische Phase wird mit 100 mL 5 %iger NaHCO<sub>3</sub>-Lösung gewaschen, dabei fällt ein farbloser Feststoff aus, der in der organischen Phase suspendiert ist. Die Phasen werden getrennt und die wässrige Phase noch zweimal mit 50 mL Dichlormethan extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen werden im Vakuum vom Lösungsmittel befreit. Der Rückstand wird mit 200 mL Eiswasser versetzt, abfiltriert, mit weiteren 100 mL Wasser gewaschen und im Vakuum getrocknet. Man erhält einen farblosen Feststoff als Rohprodukt, der mittels Flash-Säulenchromatographie gereinigt wird. Das Rohprodukt wird dazu in Methanol gelöst, auf Kieselgel aufgetragen und dann mit einem Gradienten von CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH = 98:2 bis CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH = 95:5 eluiert. Es werden 29.2 g (71 %, Literatur: 63 %<sup>[339]</sup>) des Produkts **83** als farbloser Feststoff erhalten.

**R<sub>F</sub>-Wert:** 0.34 (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH = 90:10)

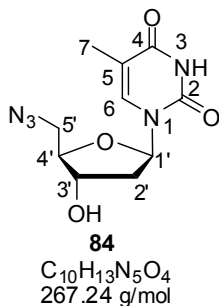
**Schmp.:** Zersetzung bei 182 °C (Literatur: 180 °C, Zersetzung<sup>[360]</sup>)

**<sup>1</sup>H-NMR** (400 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>, 300 K):  $\delta$  = 1.766 (d, 7-H<sub>3</sub>), 2.065 (ddd, 2'-H), 2.11-2.20 (m, 2'-H'), 2.412 (s, 12-H<sub>3</sub>), 3.83-3.89 (m, 4'-H), 4.12-4.21 (m, 3'-H, 5'-H), 4.258 (dd, 5'-H'), 5.419 (br. s, 3'-OH), 6.143 (t, 1'-H), 7.374 (d, 6-H), 7.44-7.50 (m, 9-H<sub>2</sub>), 7.76-7.82 (m, 10-H), 11.294 (s, N<sup>3</sup>H) ppm;  $J_{6,7}$  = 1.1 Hz

**<sup>13</sup>C-NMR** (100 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>, 300 K):  $\delta$  = 12.03 (7-C), 21.06 (12-C), 38.32 (2'-C), 69.90 (3'-C), 70.10 (5'-C), 83.17, 83.96 (1'-C, 4'-C), 109.74 (5-C), 127.55, 130.13 (9-C, 10-C), 135.83 (6-C), 132.10, 145.08 (8-C, 11-C), 150.31 (2-C), 163.58 (4-C) ppm

**ESI(+)-MS (*m/z*):**  
 ber.: 396.41 [C<sub>17</sub>H<sub>20</sub>N<sub>2</sub>O<sub>7</sub>S]  
 gef.: 397.2 [M+H]<sup>+</sup>, 418.9 [M+Na]<sup>+</sup>, 793.3 [2M+H]<sup>+</sup>,  
 810.4 [2M+NH<sub>4</sub>]<sup>+</sup>, 815.3 [2M+Na]<sup>+</sup>

## 7.2.2 Herstellung von 5'-Azido-2'-desoxythymidin **84**



Der Literatur<sup>[338]</sup> folgend werden 27.0 g 5'-*O*-Tosyl-2'-desoxythymidin **83** (68.1 mmol, 1.0 Äq.) in 150 mL trockenem DMF gelöst. Zu der Lösung werden 6.6 g Natriumazid (102.2 mmol, 1.5 Äq.) geben und eineinhalb Stunden auf 100 °C erhitzt. Nach beendeter Reaktion wird das Lösungsmittel im Ölpumpenvakuum entfernt und der Rückstand zweimal aus Wasser umkristallisiert. Es werden 13.82 g (76 %, Literatur: 75 %<sup>[338]</sup>) farbloser Feststoff als Produkt **84** erhalten.

**R<sub>F</sub>-Wert:** 0.26 (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH = 90:10)

**Schmp.:** 156-158 °C (Literatur: 162-165 °C<sup>[338]</sup>)

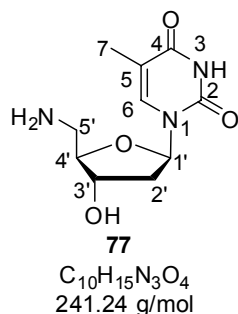
**<sup>1</sup>H-NMR** (250 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>, 300 K):  $\delta$  = 1.790 (s, 7-H<sub>3</sub>), 2.079 (ddd, 2'-H), 2.18-2.33 (m, 2'-H'), 3.556 („d“, 5'-H<sub>2</sub>), 3.841 („q“, 4'-H), 4.191 („Sextett“, 3'-H), 5.404 (d, 3'-OH), 6.200 (t, 1'-H), 7.492 (s, 6-H), 11.328 (s, N<sup>3</sup>H) ppm

**<sup>13</sup>C-NMR** (100 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>, 300 K):  $\delta$  = 12.08 (7-C), 38.06 (2'-C), 51.69 (5'-C), 70.71 (3'-C), 83.84, 84.53 (1'-C, 4'-C), 109.78 (5-C), 136.03 (6-C), 150.48 (2-C), 163.67 (4-C) ppm

**ESI(+)-MS (*m/z*):**  
 ber.: 267.24 [C<sub>10</sub>H<sub>13</sub>N<sub>5</sub>O<sub>4</sub>]  
 gef.: 267.9 [M+H]<sup>+</sup>, 289.9 [M+Na]<sup>+</sup>, 535.4 [2M+H]<sup>+</sup>.



### 7.2.3 Herstellung von 5'-Amino-2'-desoxythymidin 77



Entsprechend der Literatur<sup>[338]</sup> werden 5.6 g 5'-Azido-2'-desoxythymidin **84** (20.9 mmol, 1.0 Äq.) in 450 mL Ethanol und 50 mL Chloroform gelöst und mit 4.45 g Palladium auf Aktivkohle (10 Gew% Pd) (0.2 Äq.) versetzt. Es wird ein mit Wasserstoff gefüllter Ballon aufgesetzt, der einen Druck von ca. 1.5 bar erzeugt und 24 Stunden bei Raumtemperatur stark gerührt. Nach beendeter Reaktion wird der Katalysator über Celite abfiltriert und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Der Rückstand wird durch eine Kieselgelfritte aufgereinigt (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> bis CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH/EtMe<sub>2</sub>N = 70:30:1). Es werden 4.75 g (94 %, Literatur: 79 %<sup>[338]</sup>) des Produkts **77** als leicht gelblicher Feststoff erhalten.

**R<sub>F</sub>-Wert:** 0.05 (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH/EtMe<sub>2</sub>N = 90:10:1)

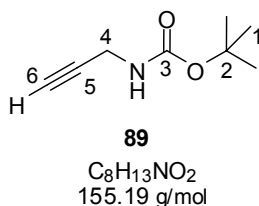
**Schmp.:** 174 °C (Literatur: 173-174 °C<sup>[338]</sup>)

**<sup>1</sup>H-NMR** (400 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>, 300 K): δ = 1.784 (d, 7-H<sub>3</sub>), 2.039 (ddd, 2'-H), 2.09-2.19 (m, 2'-H'), 2.725 (dd, 5'-H), 2.763 (dd, 5'-H'), 3.62-3.70 (m, 4'-H), 4.15-4.23 (m, 3'-H), 4.39-5.87 (br. s, 3'-OH, 5'-NH<sub>2</sub>, N<sup>3</sup>H), 6.137 („t“, 1'-H), 7.634 (s, 6-H) ppm; *J*<sub>5',5''</sub> = 13.4 Hz, *J*<sub>6,7</sub> = 1.1 Hz

**<sup>13</sup>C-NMR** (100 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>, 300 K): δ = 12.14 (7-C), 38.86 (2'-C), 43.49 (5'-C), 70.76 (3'-C), 83.45 (4'-C), 87.49 (1'-C), 109.57 (5-C), 136.27 (6-C), 150.47 (2-C), 163.73 (4-C) ppm

**ESI(+)-MS (*m/z*):** ber.: 241.24 [C<sub>10</sub>H<sub>15</sub>N<sub>3</sub>O<sub>4</sub>]  
gef.: 241.8 [M+H]<sup>+</sup>, 483.2 [2M+H]<sup>+</sup>

## 7.2.4 Herstellung von Prop-2-ynyl-carbaminsäure-*tert*-butylester **89**



Der Literaturvorschrift<sup>[361]</sup> folgend werden 7.5 g Propargylamin **150** (134.8 mmol, 1.0 Äq.) in 250 mL Dioxan gelöst. Es werden dann 60.7 g Boc<sub>2</sub>O (269.6 mmol, 2.0 Äq.) portionsweise und unter Eiskühlung zugegeben. Nach beendeter Zugabe wird eine Lösung von 17.0 g NaHCO<sub>3</sub> (202.2 mmol, 1.5 Äq.) in 500 mL Wasser zugegeben und 16 Stunden bei Raumtemperatur gerührt. Das Lösungsmittel im Vakuum entfernt und der Rückstand in 150 mL Wasser und 150 mL Essigester aufgenommen. Die Phasen werden getrennt und die wässrige Phase noch zweimal mit 150 mL Essigester extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen werden über Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> getrocknet und das Lösungsmittel wird im Vakuum entfernt. Der gelbliche, ölige Rückstand wird im Vakuum getrocknet und konnte ohne weitere Aufreinigung verwendet werden. Es werden 14.6 g (70 %, Literatur: 90 %<sup>[361]</sup>) des *N*-Boc-geschützten Propargylamins **89** erhalten.

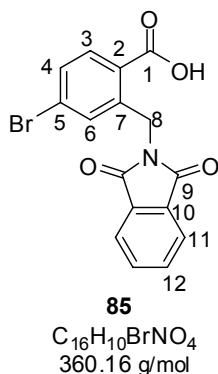
**R<sub>F</sub>-Wert:** 0.56 (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH = 90:10)

**<sup>1</sup>H-NMR** (250 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>, 300 K): δ = 1.455 (s, 1-H<sub>9</sub>), 2.218 (t, 6-H), 3.87-3.98 (m, 4-H<sub>2</sub>), 4.703 (br. s, NH) ppm

**<sup>13</sup>C-NMR** (62.5 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>, 300 K): δ = 27.57 (1-C), 28.48 (4-C), 71.37 (6-C), 80.21, 85.32 (2-C, 5-C), 146.89 (3-C) ppm

**ESI(+)-MS (*m/z*):** ber.: 155.19 [C<sub>8</sub>H<sub>13</sub>NO<sub>2</sub>]  
gef.: 155.9 [M+H]<sup>+</sup>, 99.6 [M-*t*-Bu]<sup>+</sup>

### 7.2.5 Herstellung von 4-Bromo-2-phthalimidomethylbenzoesäure **85**



In Anlehnung an die Literatur<sup>[341]</sup> werden 50 g 5-Bromophthalid **80** (0.23 mol, 1.0 Äq.) in 160 mL DMF suspendiert. Zu der Suspension werden 47 g Phthalimid Kalium (0.253 mol, 1.1 Äq.) geben. Die Lösung färbt sich sofort rot. Anschließend wird sechs Stunden unter Rückfluss erhitzt, dabei entsteht eine dunkelblaue Lösung. Nach dem Abkühlen wird das Reaktionsgemisch auf eine Lösung von 95 mL konzentrierter Essigsäure in 155 mL Wasser gegossen und 30 Minuten gerührt. Der Niederschlag wird vor dem Abfiltrieren über Nacht stehen gelassen. Dann wird abfiltriert und mit 50 mL Wasser und 50 mL Ethanol gewaschen. Der Feststoff wird dann in 120 mL 60 %igem Ethanol aufgenommen und die Suspension zehn Minuten zum Rückfluss erhitzen. Es wird heiß abfiltriert und der leicht gelbliche Feststoff **85** im Vakuum getrocknet. Es werden 71.7 g (87 %) des Produkts **85** erhalten, die ohne weitere Aufreinigung verwendet werden können.

**R<sub>F</sub>-Wert:** 0.19 (*n*Hex/EtOAc/AcOH = 1:1:0.02)

**Schmp.:** 241-242 °C

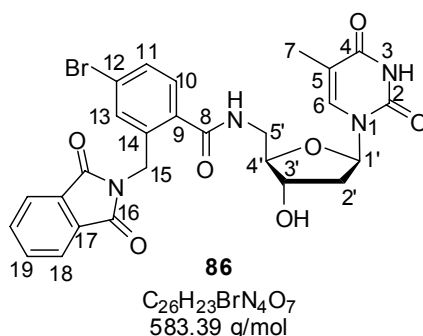
**<sup>1</sup>H-NMR** (400 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>, 300 K): δ = 5.135 (s, 8-H<sub>2</sub>), 7.419 (,d<sup>+</sup>, 6-H), 7.611 (dd, 4-H), 7.81-7.94 (m, 3-H, 11-H<sub>2</sub>, 12-H<sub>2</sub>), 13.401 (br. s, 1-OH) ppm; *J*<sub>4,6</sub> = 1.9 Hz

**<sup>13</sup>C-NMR** (100 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>, 300 K): δ = 39.32 (8-C), 123.24, 134.44 (11-C, 12-C), 126.27 (5-C), 128.49 (2-C), 129.27 (6-C), 130.40 (4-C), 131.86 (10-C), 132.63 (3-C), 140.00 (7-C), 167.52 (1-C), 167.96 (9-C) ppm

**ESI(-)-MS (*m/z*):**  
ber.: 360.16 [C<sub>16</sub>H<sub>10</sub>BrNO<sub>4</sub>]  
gef.: 357.9, 359.9 (Doppelpeak, 1:1) [M-1]<sup>-</sup>

**EA (%):**  
ber.: C: 53.36 H: 2.80 N: 3.89  
gef.: C: 53.44 H: 2.91 N: 3.67

### 7.2.6 Herstellung von 5'-Amino-N-(2-phthalimidomethyl-4-bromobenzamid)-2'-desoxythymidin **86**



Unter inerten Bedingungen werden 2.55 g 4-Bromo-2-phthalimidomethyl-benzoesäure **85** (7.08 mmol, 1.0 Äq.) in 60 mL trockenem DMF gelöst. Zu der Lösung werden 1.02 g 1-Hydroxybenzotriazol (HOBt) (7.43 mmol, 1.05 Äq.) und 1.12 mL Diisopropylcarbodiimid (DIC) (7.08 mmol, 1.0 Äq.) geben und 20 Minuten bei Raumtemperatur gerührt. In einem separaten Schlenkkolben werden 1.71 g 5'-Amino-2'-desoxythymidin **77** (7.43 mmol, 1.05 Äq.) in 40 mL trockenem DMF gelöst und zuge tropft. Es wird 18 Stunden bei Raumtemperatur gerührt, dann wird das Lösungsmittel im Ölpumpenvakuum entfernt. Da das Produkt schwerlöslich ist wird der Rückstand in Methanol gelöst, auf Kieselgel aufgetragen und mittels Flash-Säulenchromatographie gereinigt (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> bis CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH = 95:5). Es werden 3.54 g (86 %) farbloser Feststoff als Produkt **86** erhalten.

**R<sub>F</sub>-Wert:** 0.24 (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH = 90:10)

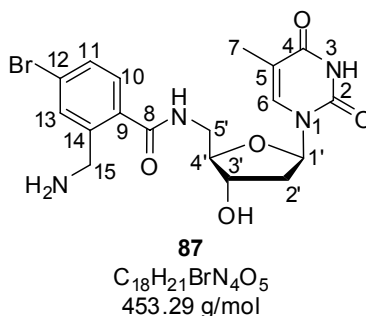
**Schmp.:** 252 °C

**<sup>1</sup>H-NMR** (400 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>, 300 K): δ = 1.751 (s, 7-H<sub>3</sub>), 2.070 (ddd, 2'-H), 2.13-2.22 (m, 2'-H'), 3.479 (s, t', 5'-H<sub>2</sub>), 3.889 (dt, 4'-H), 4.20-4.26 (m, 3'-H), 4.897 (d, 15-H), 4.953 (d, 15-H'), 5.326 (d, 3'-OH), 6.155 (dd, 1'-H), 7.385 (d, 10-H), 7.413 (d, 13-H), 7.535 (d, 6-H), 7.565 (dd, 11-H), 7.83-7.93 (m, 18-H<sub>2</sub>, 19-H<sub>2</sub>), 8.716 (t, 5'-NH), 11.260 (s, N<sup>3</sup>H) ppm; *J*<sub>1',2'</sub> = 6.1 Hz, *J*<sub>10,11</sub> = 8.1 Hz, *J*<sub>11,13</sub> = 1.8 Hz, *J*<sub>15,15'</sub> = 16.8 Hz

**<sup>13</sup>C-NMR** (100 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>, 300 K): δ = 11.98 (7-C), 38.36 (2'-C), 38.52 (15-C), 41.54 (5'-C), 71.38 (3'-C), 83.99 (1'-C), 84.73 (4'-C), 109.61 (5-C), 123.20, 134.43 (18-C, 19-C), 123.27 (12-C), 129.28 (10-C), 129.63 (13-C), 129.99 (11-C), 131.74 (17-C), 134.38, 137.05 (9-C, 14-C), 136.12 (6-C), 150.40 (2-C), 163.65 (4-C), 167.62 (8-C), 167.76 (16-C) ppm

<b>ESI(+)-MS (<i>m/z</i>):</b>	ber.: 583.39 [C <sub>26</sub> H <sub>23</sub> BrN <sub>4</sub> O <sub>7</sub> ]
	gef.: 583.3, 584.9 (Doppelpeak, 1:1) [M+H] <sup>+</sup> , 645.2, 647.2 (Doppelpeak, 1:1) [M+Na+K] <sup>+</sup>
<b>EA (%):</b>	ber.: C: 53.53 H: 3.97 N: 9.60
	gef.: C: 53.50 H: 4.11 N: 9.45

### 7.2.7 Herstellung von 5'-Amino-*N*-(2-aminomethyl-4-bromobenzamid)-2'-desoxythymidin **87**



250 mg 5'-Amino-*N*-(2-phthalimidomethyl-4-bromo-benzamid)-2'-desoxythymidin **86** (0.43 mmol, 1.0 Äq.) werden in 3 mL DMF und 4 mL Ethanol gelöst. Zu der Lösung werden 0.1 mL Hydrazin Monohydrat (2.14 mmol, 5.0 Äq.) geben und 16 Stunden bei Raumtemperatur gerührt. Die Reaktionslösung wird mit 5 mL demineralisiertem Wasser verdünnt und lyophilisiert. Der Rückstand wird in Methanol gelöst, auf Kieselgel aufgetragen und mittels Flash-Säulenchromatographie (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> + 1 % EtMe<sub>2</sub>N bis CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH/EtMe<sub>2</sub>N = 90:10:1) gereinigt. Es werden 185 mg (95 %) des entschützten Produkts **87** als farbloser Feststoff erhalten.

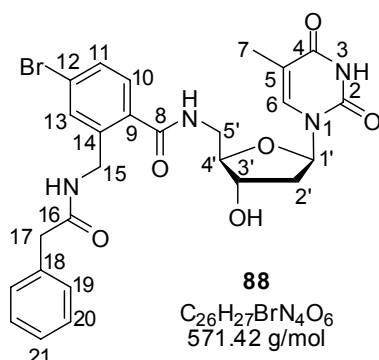
**R<sub>F</sub>-Wert:** 0.17 (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH/EtMe<sub>2</sub>N = 80:20:1)

**<sup>1</sup>H-NMR** (300 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>, 300 K): δ = 1.761 (s, 7-H<sub>3</sub>), 2.075 (ddd, 2'-H), 2.13-2.24 (m, 2'-H'), 3.04-3.56 (br. s, 3'-OH, N<sup>3</sup>H, 15-NH<sub>2</sub>), 3.43-3.56 (m, 5'-H<sub>2</sub>), 3.883 (s, 15-H<sub>2</sub>), 3.86-3.93 (m, 4'-H), 4.21-4.28 (m, 3'-H), 6.160 (t, 1'-H), 7.463 (d, 10-H), 7.531 (d, 6-H), 7.607 (dd, 11-H), 7.746 (d, 13-H), 9.212 (t, 5'-NH) ppm; *J*<sub>10,11</sub> = 8.1 Hz, *J*<sub>11,13</sub> = 2.0 Hz

**<sup>13</sup>C-NMR** (75 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>, 300 K): δ = 11.98 (7-C), 38.28 (2'-C), 41.54 (5'-C), 42.00 (15-C), 71.34 (3'-C), 84.00 (1'-C), 84.63 (4'-C), 109.66 (5-C), 123.24, 134.99, 139.54 (9-C, 12-C, 14-C), 130.00 (10-C), 130.25 (11-C), 132.60 (13-C), 136.09 (6-C), 150.40 (2-C), 163.67 (4-C), 167.84 (8-C) ppm

<b>HR-ESI(-)-MS (<i>m/z</i>):</b>	ber.: 453.0603 [C <sub>18</sub> H <sub>20</sub> BrN <sub>4</sub> O <sub>5</sub> ] <sup>-</sup>
	gef.: 453.0604

### 7.2.8 Herstellung von 5'-Amino-*N*-[2-(aminomethyl-*N*-phenylacetyl)-4-bromo-benzamid]-2'-desoxythymidin **88**



250 mg 5'-Amino-*N*-(2-phthalimidomethyl-4-bromo-benzamid)-2'-desoxythymidin **86** (0.43 mmol, 1.0 Äq.) werden unter leichtem Erwärmen in 2 mL DMF gelöst. Zu der Lösung werden 4 mL Ethanol und dann 0.06 mL Hydrazin Monohydrat (1.29 mmol, 3.0 Äq.) zugeben. Anschließend wird 16 Stunden bei Raumtemperatur gerührt. Das Lösungsmittel dann im Ölpumpenvakuum entfernt und der Rückstand für drei Stunden im Vakuum getrocknet. Er wird unter inerten Bedingungen in 3 mL trockenem DMF gelöst und auf -20 °C gekühlt. Es werden zu der gekühlten Lösung 0.3 mL Triethylamin (2.14 mmol, 5.0 Äq.) zugegeben. In einem separaten Schlenkkolben werden 203 mg Phenylacetylchlorid (1.29 mmol, 3.0 Äq.) in 2 mL trockenem DMF gelöst und mittels einer Doppelkanüle zugetropft. Es wird fünf Stunden bei 0 °C gerührt, dann wird das Lösungsmittel im Ölpumpenvakuum entfernt. Der Rückstand wird in Methanol gelöst, auf Kieselgel aufgetragen und mittels Flash-Säulenchromatographie ( $CH_2Cl_2$  bis  $CH_2Cl_2/MeOH = 95:5$ ) aufgereinigt. Es werden 171 mg (70 %) des Produkts **88** als farbloser Schaum erhalten.

**R<sub>F</sub>-Wert:** 0.35 ( $CH_2Cl_2/MeOH = 90:10$ )

**Schmp.:** 202 °C

**<sup>1</sup>H-NMR** (400 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>, 300 K):  $\delta$  = 1.756 (s, 7-*H*<sub>3</sub>), 2.067 (ddd, 2'-*H*), 2.11-2.21 (m, 2'-*H*'), 3.43-3.54 (m, 5'-*H*<sub>2</sub>, 17-*H*<sub>2</sub>), 3.882 (dt, 4'-*H*), 4.19-4.26 (m, 3'-*H*), 4.30-4.44 (m, 15-*H*<sub>2</sub>), 5.359 (d, 3-*OH*), 6.161 (dd, 1'-*H*), 7.21-7.34 (m, 10-*H*, 19-*H*<sub>2</sub>, 20-*H*<sub>2</sub>, 21-*H*), 7.348 (d, 13-*H*), 7.497 (dd, 11-*H*), 7.534 (s, 6-*H*), 8.505 (t, 15-*NH*), 8.665 (t, 5'-*NH*), 11.295 (s, *N*<sup>3</sup>*H*) ppm;  $J_{1',2'} = 6.1$  Hz,  $J_{11,13} = 1.7$  Hz

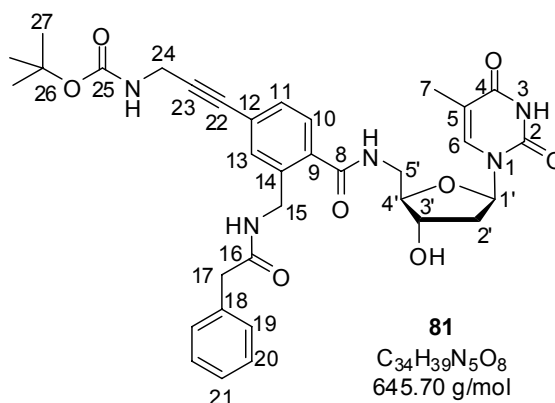
**<sup>13</sup>C-NMR** (100 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>, 300 K):  $\delta$  = 12.04 (7-*C*), 38.39 (2'-*C*), 39.59 (15-*C*), 41.58, 42.39 (5'-*C*, 17-*C*), 71.48 (3'-*C*), 84.14 (1'-*C*), 84.88 (4'-*C*), 109.74 (5-*C*), 123.12 (12-*C*), 126.50, 128.35, 128.96, 129.44, 129.45 (10-*C*, 11-*C*, 19-*C*, 20-*C*, 21-*C*), 129.91

(13-C), 134.51, 140.03 (9-C, 14-C), 136.15 (6-C), 136.22 (18-C), 150.48 (2-C), 163.77 (4-C), 167.89 (8-C), 170.66 (16-C) ppm

**ESI(+)-MS ( $m/z$ ):**  
 ber.: 571.42 [ $C_{26}H_{27}BrN_4O_6$ ]  
 gef.: 571.3, 573.0 (Doppelpeak, 1:1) [ $M+H$ ]<sup>+</sup>, 592.9, 595.3 (Doppelpeak, 1:1) [ $M+Na$ ]<sup>+</sup>

**EA (%):**  
 ber.: C: 54.65 H: 4.76 N: 9.80  
 gef.: C: 54.93 H: 4.90 N: 10.02

### 7.2.9 Herstellung von 5'-Amino-*N*-[2-(aminomethyl-*N*-phenylacetyl)4-(*tert*-butoxycarbonylamino-prop-2-ynyl)benzamid]-2'-desoxythymidin **81**



Unter inerten Bedingungen werden 660 mg 5'-Amino-*N*-[2-(aminomethyl-*N*-phenylacetyl)4-bromobenzamid]-2'-desoxythymidin **88** (1.15 mmol, 1.0 Äq.) in 15 mL trockenem DMF gelöst. Dazu werden 0.8 mL Triethylamin (5.78 mmol, 5.0 Äq.) gegeben und die Lösung dreimal mittels Gefrier-Entgasung entgast. Nach dem Auftauen werden 45 mg Kupfer(I)iodid (0.23 mmol, 0.2 Äq.) und 135 mg Tetrakis(triphenylphosphan)palladium (0.12 mmol, 0.1 Äq.) zugeben und auf 80 °C erwärmt. Das Alkin **89** (717 mg, 4.62 mmol, 4.0 Äq.) wird in drei Portionen zugeben, ein Drittel direkt, ein Drittel nach zwei Stunden bei 80 °C und ein Drittel nach fünf Stunden. Insgesamt wird 18 Stunden bei 80 °C gerührt. Da das Edukt und das Produkt auf dem DC nicht zu unterscheiden sind, wird zu Kontrolle der Reaktion eine kleine Probe entnommen und mittels RP-HPLC analysiert. Im Ölpumpenvakuum wird das Lösungsmittel entfernt und der Rückstand in 50 mL 5 %iger EDTA-Lösung und 75 mL Dichlormethan aufgenommen und fünf Minuten stark gerührt. Die Phasen werden getrennt und die organische Phase noch mal mit 50 mL 5 %iger EDTA-Lösung und mit 50 mL gesättigter NaCl-Lösung gewaschen. Die wässrigen Phasen werden noch zweimal mit

50 mL Dichlormethan rückextrahiert. Die vereinigten organischen Phasen werden über  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  getrocknet und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Das Rohprodukt wird durch Flash-Säulenchromatographie ( $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  bis  $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH} = 95:5$ ) gereinigt und es werden 708 mg (95 %) eines leicht gelblichen Feststoffs des Safety-Catch-Linkers **81** erhalten.

**R<sub>F</sub>-Wert:** 0.32 ( $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH} = 90:10$ )

**Schmp.:** 213 °C

**<sup>1</sup>H-NMR** (400 MHz, DMSO- $d_6$ , 300 K):  $\delta$  = 1.412 (s, 27-H<sub>9</sub>), 1.761 (d, 7-H<sub>3</sub>), 2.070 (ddd, 2'-H), 2.12-2.20 (m, 2'-H'), 3.42-3.55 (m, 5'-H<sub>2</sub>, 17-H<sub>2</sub>), 3.890 (dt, 4'-H), 4.007 (d, 24-H<sub>2</sub>), 4.19-4.27 (m, 3'-H), 4.31-4.43 (m, 15-H<sub>2</sub>), 5.338 (d, 3'-OH), 6.171 (dd, 1'-H), 7.22-7.40 (m, 10-H, 11-H, 13-H, 19-H<sub>2</sub>, 20-H<sub>2</sub>, 21-H, 25-NH), 7.547 (d, 6-H), 8.466 (t, 15-NH), 8.668 (t, 5'-NH), 11.298 (s, N<sup>3</sup>H) ppm;  $J_{6,7} = 1.0$  Hz

**<sup>13</sup>C-NMR** (100 MHz, DMSO- $d_6$ , 300 K):  $\delta$  = 12.03 (7-C), 28.21 (27-C), 30.14 (24-C), 38.35 (2'-C), 39.63 (15-C), 41.53, 42.34 (5'-C, 17-C), 71.46 (3'-C), 78.34 (26-C), 80.83 (22-C), 88.85 (23-C), 84.08 (1'-C), 84.90 (4'-C), 109.70 (5-C), 123.63 (12-C), 126.41, 127.70, 128.29, 128.95, 129.28, 130.17 (10-C, 11-C, 13-C, 19-C, 20-C, 21-C), 135.15 (9-C), 136.09 (6-C), 136.22 (18-C), 137.81 (14-C), 150.46 (2-C), 155.31 (25-C), 162.72 (4-C), 168.09 (8-C), 170.48 (16-C) ppm

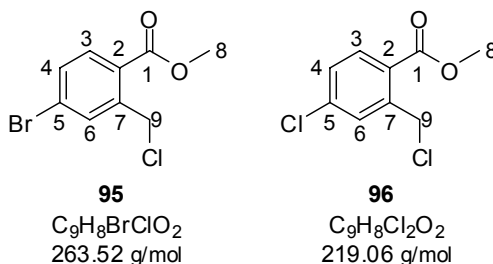
**ESI(+)-MS (*m/z*):** ber.: 645.70 [ $\text{C}_{34}\text{H}_{39}\text{N}_5\text{O}_8$ ]  
gef.: 646.5 [ $\text{M}+\text{H}$ ]<sup>+</sup>

**EA (%):** ber.: C: 63.24 H: 6.09 N: 10.85  
gef.: C: 63.01 H: 6.19 N: 10.65



## 7.3 Herstellung der Ester-verknüpften, enzymatisch spaltbaren Safety-Catch-Linker 82 und 111

### 7.3.1 Herstellung von 2-Chloromethyl-4-bromobenzoessäure-methylester **95**



In Anlehnung an die Literatur<sup>[342]</sup> werden 17.0 g 5-Bromophthalid **80** (78.2 mmol, 1.0 Äq.) und 30.6 g Triphenylphosphandichlorid (89.94 mmol, 1.15 Äq.) unter inerten Bedingungen gemischt und zwei Stunden auf 180 °C erhitzt. Dabei entsteht eine braune Schmelze, die anschließend auf 0 °C abgekühlt und nacheinander mit 20 mL Methanol und 20 mL Pyridin versetzt wird. Es wird eineinhalb Stunden bei 0 °C gerührt und die Mischung dann auf 200 mL Wasser und 400 mL *n*Hexan gegossen. Der ausgefallene Feststoff wird abfiltriert und verworfen. Die Phasen werden getrennt und die organische Phase mit 50 mL gesättigter NaCl-Lösung gewaschen, über  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  getrocknet und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Das Rohprodukt wird durch Flash-Säulenchromatographie aufgereinigt (*n*Hexan bis *n*Hexan/Essigester = 9:1). Man erhält 16.79 g einer nicht trennbaren Mischung aus 2-Chloromethyl-4-bromo-benzoessäure-methylester **95** und 2-Chloromethyl-4-chloro-benzoessäuremethylester **96** im Verhältnis 86:14.<sup>[362]</sup> Die Ausbeuten der einzelnen Komponenten betragen 72 % (14.82 g) der Verbindung **95** und 12 % (1.97 g) der Verbindung **96**.<sup>[362]</sup>

#### Analytik der Hauptkomponente **95**:

**R<sub>F</sub>-Wert:** 0.33 (*n*Hex/EtOAc = 9:1)

**<sup>1</sup>H-NMR** (400 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>, 300 K):  $\delta$  = 3.860 (s, 8- $\text{H}_3$ ), 5.051 (s, 9- $\text{H}_2$ ), 7.703 (dd, 4- $\text{H}$ ), 7.810 (d, 3- $\text{H}$ ), 7.874 (d, 6- $\text{H}$ ) ppm;  $J_{3,4}$  = 8.3 Hz,  $J_{4,6}$  = 1.9 Hz

**<sup>13</sup>C-NMR** (100 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>, 300 K):  $\delta$  = 43.13 (8-C), 52.45 (9-C), 126.03, 128.22, 140.44 (2-C, 5-C, 7-C), 131.74 (4-C), 132.54 (3-C), 133.79 (6-C), 165.81 (1-C) ppm

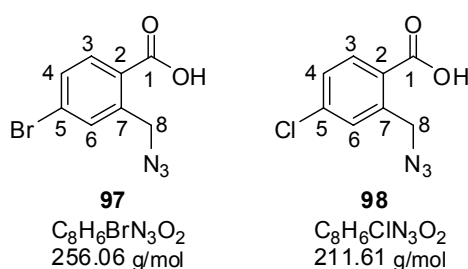
**ESI(+)-MS ( $m/z$ ):** ber.: 263.52 [ $C_9H_8BrClO_2$ ]  
 gef.: 261.9, 263.7 (Doppelpeak, 2.7:1) [ $M+1$ ]<sup>+</sup>

### Analytik des Nebenprodukts **96**:

**R<sub>F</sub>-Wert:** 0.33 ( $n$ Hex/EtOAc = 9:1)

**<sup>1</sup>H-NMR** (400 MHz, DMSO- $d_6$ , 300 K):  $\delta$  = 3.860 (s, 8- $H_3$ ), 5.059 (s, 9- $H_2$ ), 7.565 (dd, 4- $H$ ), 7.726 (d, 6- $H$ ), 7.894 (d, 3- $H$ ) ppm;  $J_{3,4}$  = 8.6 Hz,  $J_{4,6}$  = 2.3 Hz

## 7.3.2 Herstellung von 2-Azidomethyl-4-bromobenzoessäure **97**



9.8 g des 86:14-Gemischs aus 2-Chloromethyl-4-bromo-benzoessäuremethylester **95** und 2-Chloromethyl-4-chloro-benzoessäuremethylester **96** (38.0 mmol, 1.0 Äq.) werden in 50 mL Ethanol gelöst und zu der Lösung 25 mL demineralisiertes Wasser und 6.1 g Natriumazid (92.9 mmol, 2.4 Äq.) geben. Es wird zwei Stunden auf 60 °C erwärmt. Anschließend wird die Reaktionslösung im Vakuum auf ein Drittel ihres Volumens reduziert, einmal mit 50 mL  $n$ Hexan und zweimal mit 100 mL Essigester extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen werden über  $Na_2SO_4$  getrocknet und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Der Rückstand wird direkt weiter zur Entschützung des Methylesters eingesetzt. Dazu wird das Zwischenprodukt in 50 mL Methanol aufgenommen und eine Lösung aus 3.0 g NaOH (76.1 mmol, 2.0 Äq.) in 20 mL demineralisiertem Wasser zugeben. Es wird drei Stunden bei Raumtemperatur stark gerührt. Dann wird wieder im Vakuum auf ein Drittel des Volumens reduziert und mit 9 mL konzentrierter HCl angesäuert. Die wässrige Phase wird dreimal mit je 50 mL Essigester extrahiert, die vereinigten organischen Phasen werden über  $Na_2SO_4$  getrocknet und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Der Rückstand wird aus  $n$ Hexan umkristallisiert und man erhält 7.46 g leicht orangefarbene Nadeln, die aus einem nicht trennbaren Gemisch an 2-Azidomethyl-4-bromobenzoessäure **97** und 2-Azidomethyl-4-chlorobenzoessäure **98** im Verhältnis 86:14 bestehen.<sup>[362]</sup> Die Ausbeuten der einzelnen

Komponenten betragen 67 % (6.54 g) der Verbindung **97** und 11 % (919 mg) der Verbindung **98**.<sup>[362]</sup>

Die Zusammensetzung der Mischung (**97/98** = 86:14) konnte durch eine Elementaranalyse, berechnet aus den im <sup>1</sup>H-NMR bestimmten Anteilen, bestätigt werden:

<b>EA (%)</b> :	ber.:	C: 38.64	H: 2.43	N: 16.89
	gef.:	C: 38.32	H: 2.25	N: 17.13

#### **Analytik der Hauptkomponente 97:**

**R<sub>F</sub>-Wert:** 0.52 (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH/AcOH = 90:10:1)

**<sup>1</sup>H-NMR** (300 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>, 300 K): δ = 4.820 (s, 8-H<sub>2</sub>), 7.679 (dd, 4-H), 7.753 (d, 6-H), 7.860 (3-H), 13.397 (br. s, 1-OH) ppm; *J*<sub>3,4</sub> = 8.4 Hz, *J*<sub>4,6</sub> = 2.3 Hz

**<sup>13</sup>C-NMR** (75 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>, 300 K): δ = 51.43 (8-C), 125.95, 129.15, 139.02 (2-C, 5-C, 7-C), 131.27 (4-C), 132.76 (3-C), 132.82 (6-C), 167.20 (1-C) ppm

**ESI(-)-MS (*m/z*):**  
 ber.: 256.06 [C<sub>8</sub>H<sub>6</sub>BrN<sub>3</sub>O<sub>2</sub>]  
 gef.: 253.7, 255.8 (Doppelpeak, 1:1) [M-1]<sup>-</sup>, 228.7, 230.7 (Doppelpeak, 1:1) [M-N<sub>2</sub>]<sup>-</sup>

#### **Analytik des Nebenprodukts 98:**

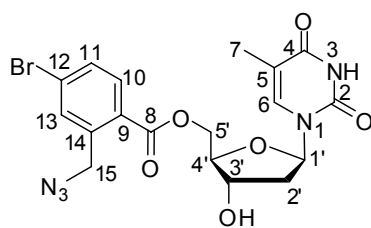
**R<sub>F</sub>-Wert:** 0.52 (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH/AcOH = 90:10:1)

**<sup>1</sup>H-NMR** (300 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>, 300 K): δ = 4.827 (s, 8-H<sub>2</sub>), 7.539 (dd, 4-H), 7.614 (d, 6-H), 7.944 (3-H), 13.397 (br. s, 1-OH) ppm; *J*<sub>3,4</sub> = 8.6 Hz, *J*<sub>4,6</sub> = 2.3 Hz

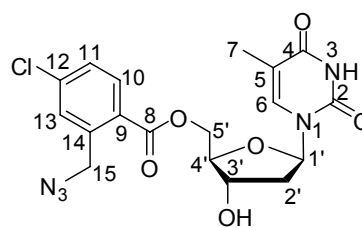
**<sup>13</sup>C-NMR** (75 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>, 300 K): δ = 51.50 (8-C), 128.74, 132.72, 136.99 (2-C, 5-C, 7-C), 128.26 (4-C), 129.86 (6-C), 132.82 (3-C), 167.06 (1-C) ppm

**ESI(-)-MS (*m/z*):**  
 ber.: 211.61 [C<sub>8</sub>H<sub>6</sub>ClN<sub>3</sub>O<sub>2</sub>]  
 gef.: 209.7, 211.7 (Doppelpeak, 3.2:1) [M-1]<sup>-</sup>, 184.7, 186.6 (Doppelpeak, 3.5:1) [M-N<sub>2</sub>]<sup>-</sup>

### 7.3.3 Herstellung von 5'-(2-Azidomethyl-4-bromobenzoat)-2'-desoxythymidin **99**

**99**

$C_{18}H_{18}BrN_5O_6$   
480.27 g/mol

**100**

$C_{18}H_{18}ClN_5O_6$   
435.82 g/mol

In Anlehnung an die Literatur<sup>[343]</sup> werden 3.0 g 2'-Desoxythymidin **78** (12.4 mmol, 1.0 Äq.) und 4.76 g der 86:14-Mischung aus 2-Azidomethyl-4-bromobenzoessäuremethylester **97** und 2-Azidomethyl-4-chlorobenzoessäuremethylester **98** (18.6 mmol, 1.5 Äq.) in zwei separaten Kolben für 24 Stunden im Vakuum getrocknet. Beide Verbindungen werden unter inerten Bedingungen in jeweils 75 mL trockenem Pyridin gelöst und zusammengegeben. Zu der Lösung der Edukte **78** und **97/98** werden 9.8 g Bis(2-oxo-3-oxazolidinyl)phosphinsäurechlorid **90** (37.2 mmol, 3.0 Äq.) geben und fünf Stunden bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend wird das Lösungsmittel im Vakuum entfernt, der Rückstand in einer Mischung aus Dichlormethan und Methanol gelöst, auf Kieselgel aufgetragen und mittels Flash-Säulenchromatographie ( $CH_2Cl_2$  bis  $CH_2Cl_2/MeOH = 95:5$ ) gereinigt. Man erhält 4.15 g (farbloser Feststoff) eines untrennbaren Gemischs der beiden Produkte 5'-(2-Azidomethyl-4-bromobenzoat)-2'-desoxythymidin **99** und 5'-(2-Azidomethyl-4-chlorobenzoat)-2'-desoxythymidin **100** im Verhältnis 84:16.<sup>[362]</sup> Die Ausbeuten der einzelnen Komponenten beträgt 60 % (3.54 g) des Hauptprodukts **99** und 11 % (611 mg) des Nebenprodukts **100**.<sup>[362]</sup>

#### Analytik des Hauptprodukts **99**:

**R<sub>F</sub>-Wert:** 0.41 ( $CH_2Cl_2/MeOH = 90:10$ )

**<sup>1</sup>H-NMR** (400 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>, 300 K):  $\delta$  = 1.636 (s, 7-H<sub>3</sub>), 2.10-2.20 (m, 2'-H), 2.20-2.33 (m, 2'-H'), 4.01-4.09 (m, 4'-H), 4.33-4.39 (3'-H), 4.39-4.48 (m, 5'-H), 4.518 (dd, 5'-H'), 4.799 (s, 15-H<sub>2</sub>), 5.474 (d, 3'-OH), 6.209 (t, 1'-H), 7.406 (s, 6-H), 7.729 (d, 11-H), 7.807 (s, 13-H), 7.870 (d, 10-H), 11.299 (s, N<sup>3</sup>H) ppm;  $J_{10,11} = 8.7$  Hz

**<sup>13</sup>C-NMR** (100 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>, 300 K):  $\delta$  = 11.86 (7-C), 38.50 (2'-C), 51.22 (15-C), 64.93 (5'-C), 70.21 (3'-C), 83.35 (4'-C), 83.89 (1'-C), 109.74 (5-C), 126.56, 127.95,

139.08 (9-C, 12-C, 14-C), 131.47 (11-C), 132.46 (10-C), 132.98 (13-C), 135.88 (6-C), 150.37 (2-C), 163.60 (4-C), 165.30 (8-C) ppm

**ESI(+)-MS ( $m/z$ ):** ber.: 482.27 [ $C_{18}H_{18}BrN_5O_6$ ]  
gef.: 480.1, 482.0 (Doppelpeak, 1:1) [ $M+H$ ]<sup>+</sup>, 497.2, 499.1 (Doppelpeak, 1:1) [ $M+NH_4$ ]<sup>+</sup>

**HR-ESI(-)-MS ( $m/z$ ):** ber.: 478.0357, 480.0337 (Doppelpeak, 1:1) [ $C_{18}H_{17}BrN_5O_6$ ]<sup>-</sup>  
gef.: 478.0367, 480.0355 (Doppelpeak, 1:1)

#### Analytik des Nebenprodukts 100:

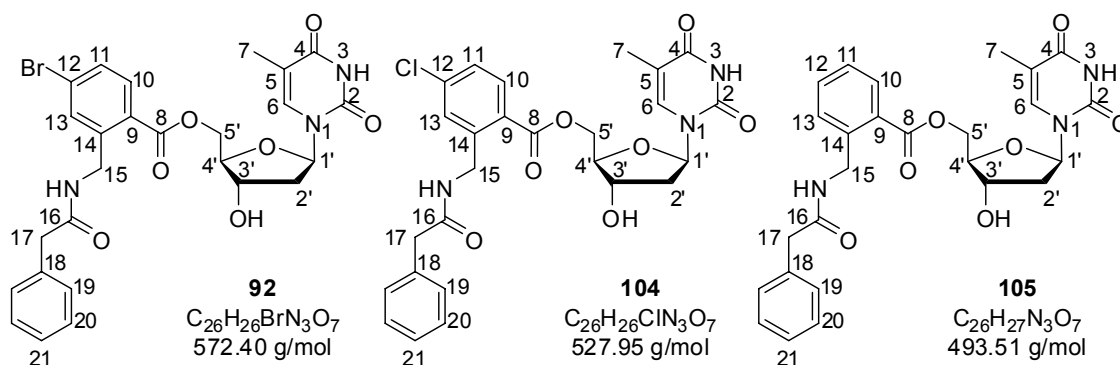
**R<sub>F</sub>-Wert:** 0.41 (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH = 90:10)

**<sup>1</sup>H-NMR** (400 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>, 300 K): δ = 7.589 (d, 11-H), 7.668 (s, 13-H), 7.957 (d, 10-H) ppm, alle anderen Signale liegen unter den Signalen des Hauptprodukts;  $J_{10,11}$  = 8.4 Hz

**<sup>13</sup>C-NMR** (100 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>, 300 K): δ = 128.46 (11-C), 130.05 (13-C) ppm, alle anderen Signale liegen unter den Signalen des Hauptprodukts.

**ESI(+)-MS ( $m/z$ ):** ber.: 480.27 [ $C_{18}H_{18}ClN_5O_6$ ]  
gef.: 436.1, 437.4 (Doppelpeak, 3:1) [ $M+H$ ]<sup>+</sup>

### 7.3.4 Herstellung von 5'-[2-(Aminomethyl-*N*-phenylacetyl)-4-bromobenzoat]-2'-desoxythymidin **92**



1 g der 84:16-Mischung aus 5'-(2-Azidomethyl-4-bromobenzoat)-2'-desoxythymidin **99** und 5'-(2-Azidomethyl-4-chlorobenzoat)-2'-desoxythymidin **100** (2.1 mmol, 1.0 Äq.) werden in 120 mL Ethanol und 30 mL Chloroform suspendiert, mit 47 mg Platindioxid (0.21 mmol, 0.1 Äq.) und 0.5 mL konzentrierter HCl versetzt und 24 Stunden bei Raumtemperatur unter Wasserstoffatmosphäre (Wasserstoff gefüllter Ballon, ca. 1.5 bar) gerührt. Der Katalysator wird über Celite abfiltriert und das Lösungsmittel im

Vakuum entfernt. Das rohe Hydrochlorid wird für 16 Stunden im Vakuum getrocknet und anschließend unter inerten Bedingungen in 20 mL trockenem DMF gelöst und auf 0 °C gekühlt. Zu der gekühlten Lösung werden erst 1.74 mL (10.5 mmol, 5.0 Äq.) *N*-Ethyl-diisopropylamin und dann 0.70 mL (5.3 mmol, 2.5 Äq.) Phenylacetylchlorid zugetropft. Es wird drei Stunden bei 0 °C gerührt, das Lösungsmittel im Ölpumpenvakuum entfernt und der Rückstand durch Flash-Säulenchromatographie (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH = 98:2 bis CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH = 95:5) gereinigt. Man erhält 644 mg (farbloser Feststoff) eines nicht trennbaren Gemischs aus den brom- bzw. chlosubstituierten Verbindungen **92** und **104** sowie dem dehalogenierten Nebenprodukt **105** im Verhältnis 71:14:15.<sup>[362]</sup> Die Ausbeuten der einzelnen Komponenten betragen 39 % (472 mg) des Hauptprodukts **92**, 8 % (87 mg) des chlorierten Produkts **104** und 8 % (85 mg) des Nebenprodukts **105**.<sup>[362]</sup>

#### Analytik des Hauptprodukts **92**:

**R<sub>F</sub>-Wert:** 0.23 (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH = 90:10)

**<sup>1</sup>H-NMR** (300 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>, 300 K): δ = 1.627 (d, 7-H<sub>3</sub>), 2.08-2.30 (m, 2'-H<sub>2</sub>), 3.512 (s, 17-H<sub>2</sub>), 4.00-4.08 (m, 4'-H), 4.31-4.45 (m, 3'-H, 5'-H), 4.490 (dd, 5'-H'), 4.576 (d, 15-H<sub>2</sub>), 5.481 (d, 3'-OH), 6.209 (t, 1'-H), 7.20-7.33 (m, 19-H<sub>2</sub>, 20-H<sub>2</sub>, 21-H), 7.406 (d, 6-H), 7.460 (d, 13-H), 7.594 (dd, 11-H), 7.803 (d, 10-H), 8.525 (t, 15-NH), 11.318 (s, N<sup>3</sup>H) ppm; *J*<sub>6,7</sub> = 1.0 Hz, *J*<sub>10,11</sub> = 8.4 Hz, *J*<sub>11,13</sub> = 2.0 Hz, *J*<sub>15,NH</sub> = 6.0 Hz

**<sup>13</sup>C-NMR** (75 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>, 300 K): δ = 11.92 (7-C), 38.51 (2'-C), 40.29 (15-C), 42.39 (17-C), 64.82 (5'-C), 70.26 (3'-C), 83.90 (4'-C), 83.90 (1'-C), 109.80 (5-C), 126.46, 128.32, 128.92 (19-C, 20-C, 21-C), 126.58, 127.24, 143.19 (9-C, 12-C, 14-C), 129.99 (11-C), 130.55 (13-C), 132.25 (10-C), 135.86 (6-C), 136.22 (18-C), 150.38 (2-C), 163.62 (4-C), 165.58 (8-C), 170.53 (16-C) ppm

**ESI(+)-MS (*m/z*):** ber.: 572.40 [C<sub>26</sub>H<sub>26</sub>BrN<sub>3</sub>O<sub>7</sub>]  
gef.: 572.3, 574.3 (Doppelpeak, 1:1) [M+H]<sup>+</sup>

**HR-ESI(-)-MS (*m/z*):** ber.: 570.0870, 572.0851 (Doppelpeak, 1:1)  
[C<sub>26</sub>H<sub>25</sub>BrN<sub>3</sub>O<sub>7</sub>]<sup>-</sup>  
gef.: 570.0899, 572.0900 (Doppelpeak, 1:1)

#### Analytik des chlorierten Produkts **104**:

**R<sub>F</sub>-Wert:** 0.23 (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH = 90:10)

**$^1\text{H-NMR}$**  (300 MHz,  $\text{DMSO-d}_6$ , 300 K):  $\delta = 7.888$  (d, 10-H) ppm, alle anderen Signale liegen unter den Signalen des Hauptprodukts.

**ESI(+)-MS ( $m/z$ ):** ber.: 527.95 [ $\text{C}_{26}\text{H}_{26}\text{ClN}_3\text{O}_7$ ]  
gef.: 528.2, 529.6 (Doppelpeak, 3:1) [ $\text{M}+\text{H}$ ] $^+$

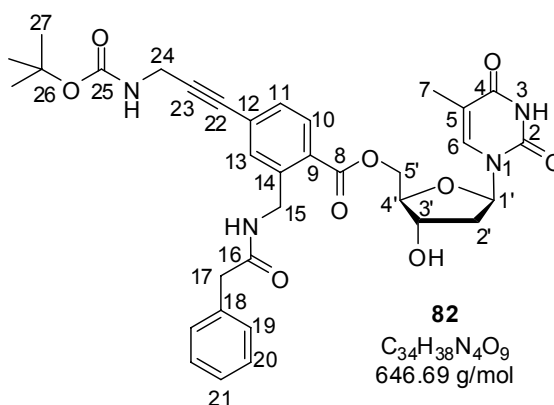
**Analytik des dehalogenierten Produkts 105:**

**$R_F$ -Wert:** 0.23 ( $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH} = 90:10$ )

**$^1\text{H-NMR}$**  (300 MHz,  $\text{DMSO-d}_6$ , 300 K):  $\delta = 1.605$  (br. s, 7- $\text{H}_3$ ), 3.499 (s, 17- $\text{H}_2$ ), 7.532 (dd), 7.869 (d) ppm, alle anderen Signale liegen unter den Signalen des Hauptprodukts.

**ESI(+)-MS ( $m/z$ ):** ber.: 493.51 [ $\text{C}_{26}\text{H}_{27}\text{N}_3\text{O}_7$ ]  
gef.: 494.2 [ $\text{M}+\text{H}$ ] $^+$

### 7.3.5 Herstellung von 5'-Amino-*N*-[2-(aminomethyl-*N*-phenylacetyl)4-(*tert*-butoxycarbonylamino-prop-2-ynyl)-benzoat]-2'-desoxythymidin **82**



Es werden 700 mg der 71:14:15-Mischung aus 5'-[2-(Aminomethyl-*N*-phenylacetyl)-4-bromobenzoat]-2'-desoxythymidin **92**, 5'-[2-(Aminomethyl-*N*-phenylacetyl)-4-chlorobenzoat]-2'-desoxythymidin **104** und 5'-[2-(Aminomethyl-*N*-phenylacetyl)benzoat]-2'-desoxythymidin **105** eingesetzt. Da das reduzierte Nebenprodukt nicht in der Sonogashira Reaktion umgesetzt werden kann, wird es aus der eingesetzten Masse herausgerechnet. Es werden also 595 mg (1.06 mmol, 1.0 Äq.) der Mischung aus **92** und **104** eingesetzt. Die Edukte werden in 12 mL trockenem DMF gelöst, mit 0.85 mL Triethylamin (6.1 mmol, 5.8 Äq.) versetzt und dreimal mittels Gefrier-Entgasung entgast. Nach dem Auftauen werden zunächst 48 mg Kupfer(I)iodid (0.24 mmol, 0.2 Äq.) und 143 mg Tetrakis(triphenylphosphan)palladium (0.12 mmol, 0.1 Äq.)

zugeben, dann werden 474 mg des *N*-Boc-geschützten Propargylamins **89** (3.06 mmol, 2.9 Äq.) zugetropft. Es wird sechs Stunden bei 80 °C gerührt und nachdem die RP-HPLC Analyse die Vollständigkeit der Reaktion anzeigte das Lösungsmittel im Ölpumpenvakuum entfernt. Das Rohprodukt wird zunächst über eine Kieselgelfritte (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH = 90:10) vorgereinigt und dann mittels Flash-Säulenchromatographie (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> bis CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH = 95:5) aufgereinigt. Es werden 597 mg (87 %) des Safety-Catch-Linkers **82** als leicht gelber Schaum erhalten.

**R<sub>F</sub>-Wert:** 0.27 (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH = 90:10)

**<sup>1</sup>H-NMR** (400 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>, 300 K): δ = 1.410 (s, 27-H<sub>9</sub>), 1.622 (s, 7-H<sub>3</sub>), 2.138 (ddd, 2'-H), 2.19-2.29 (m, 2'-H'), 3.500 (s, 17-H<sub>2</sub>), 3.98-4.06 (m, 4'-H, 24-H<sub>2</sub>), 4.32-4.38 (m, 3'-H), 4.405 (dd, 5'-H), 4.484 (dd, 5'-H'), 4.563 (d, 15-H<sub>2</sub>), 5.466 (d, 3'-OH), 6.206 (t, 1'-H), 7.20-7.44 (m, 6-H, 11-H, 13-H, 19-H<sub>2</sub>, 20-H<sub>2</sub>, 21-H), 7.854 (d, 10-H), 8.468 (t, 15-NH), 11.296 (s, N<sup>3</sup>H) ppm; *J*<sub>5',5''</sub> = 11.9 Hz, *J*<sub>15,NH</sub> = 6.0 Hz

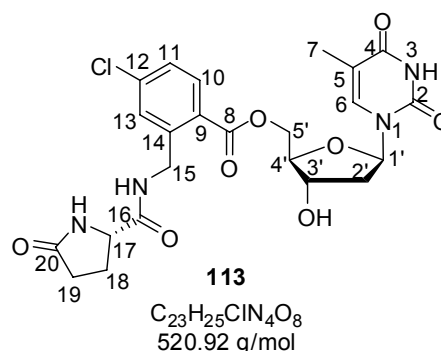
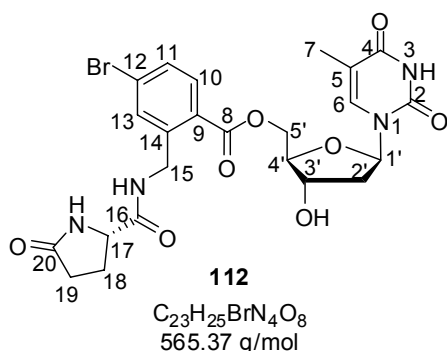
**<sup>13</sup>C-NMR** (100 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>, 300 K): δ = 11.89 (7-C), 28.18 (27-C), 30.16 (24-C), 38.51 (2'-C), 40.33 (15-C), 42.38 (17-C), 64.69 (5'-C), 70.24 (3'-C), 78.35 (26-C), 80.52, 90.60 (22-C, 23-C), 83.43 (4'-C), 83.86 (1'-C), 109.77 (5-C), 125.96 (12-C), 126.38, 128.28, 128.91, 129.59, 130.56, 130.64 (10-C, 11-C, 13-C, 19-C, 20-C, 21-C), 127.65, 136.20, 141.09 (9-C, 14-C, 18-C), 135.81 (6-C), 150.37 (2-C), 155.27 (25-C), 163.58 (4-C), 165.65 (8-C), 170.79 (16-C) ppm

**ESI(+)-MS (*m/z*):** ber.: 646.69 [C<sub>34</sub>H<sub>38</sub>N<sub>4</sub>O<sub>9</sub>]  
gef.: 547.5 [M-Boc]<sup>+</sup>, 664.8 [M+NH<sub>4</sub>]<sup>+</sup>, 647.7 [M+H]<sup>+</sup>

**HR-ESI(-)-MS (*m/z*):** ber.: 645.2555 [C<sub>34</sub>H<sub>37</sub>N<sub>4</sub>O<sub>9</sub>]<sup>-</sup>  
gef.: 645.2580



### 7.3.6 Herstellung von 5'-[2-(Aminomethyl-*N*-(*S*)-pyroglutamyl)-4-bromobenzoat]-2'-desoxythymidin **112**



1 g der 84:16-Mischung aus 5'-(2-Azidomethyl-4-bromobenzoat)-2'-desoxythymidin **99** und 5'-(2-Azidomethyl-4-chlorobenzoat)-2'-desoxythymidin **100** (2.1 mmol, 1.0 Äq.) werden in 120 mL Ethanol und 30 mL Chloroform suspendiert, mit 47 mg Platindioxid (0.21 mmol, 0.1 Äq.) und 30 Tropfen konzentrierter HCl versetzt und 24 Stunden bei Raumtemperatur unter Wasserstoffatmosphäre (Wasserstoff gefüllter Ballon, ca. 1.5 bar) gerührt. Der Katalysator wird über Celite abfiltriert und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Das rohe Hydrochlorid wird für 16 Stunden im Vakuum getrocknet und anschließend unter inerten Bedingungen in 10 mL trockenem DMF gelöst und auf 0 °C gekühlt. Zu der gekühlten Lösung werden dann 1.74 mL Triethylamin (12.5 mmol, 6.0 Äq.) zugegeben. In einem separaten Schlenkkolben werden 1.57 g Pyroglutamyl-pentachlorphenylester **110** (4.16 mmol, 2.0 Äq.) in 10 mL trockenem DMF suspendiert und mittels einer Spritze zu der gekühlten Lösung des Amins getropft. Es wird eine Stunde bei 0 °C und zwei Stunden bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend wird das Lösungsmittel im Ölpumpenvakuum entfernt und der Rückstand durch zweimalige Flash-Säulenchromatographie (erster Gradient:  $CH_2Cl_2/MeOH/EtMe_2N = 98:2:0.5$  bis  $CH_2Cl_2/MeOH/EtMe_2N = 90:10:0.5$ , zweiter Gradient:  $CH_2Cl_2/MeOH = 98:2$  bis  $CH_2Cl_2/MeOH = 95:5$ ) gereinigt. Man erhält 893 mg (farbloser Feststoff) eines nicht trennbaren Gemischs aus den brom- bzw. chlosubstituierten Verbindungen **112** und **113** im Verhältnis 85:15.<sup>[362]</sup> Die Ausbeuten der einzelnen Komponenten betragen 65 % (772 mg) des Hauptprodukts **112** und 11 % (121 mg) des chlorierten Produkts **113**.

**Analytik des Hauptprodukts 112:**

**R<sub>F</sub>-Wert:** 0.08 (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH = 90:10)

**<sup>1</sup>H-NMR** (300 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>, 300 K): δ = 1.642 (s, 7-H<sub>3</sub>), 1.80-1.93 (m, 18/19-H), 2.08-2.39 (m, 2'-H<sub>2</sub>, 18/19-H<sub>3</sub>), 4.00-4.12 (m, 4'-H, 17-H), 4.31-4.68 (m, 3'-H, 5'-H<sub>2</sub>, 15-H<sub>2</sub>), 5.487 (d, 3'-OH), 6.209 (t, 1'-H), 7.416 (d, 6-H), 7.573 (d, 13-H), 7.628 (dd, 11-H), 7.820 (d, 10-H), 7.926 (s, 17-NH), 8.461 (t, 15-NH), 11.321 (s, N<sup>3</sup>H) ppm; *J*<sub>10,11</sub> = 8.3 Hz, *J*<sub>11,13</sub> = 1.9 Hz

**<sup>13</sup>C-NMR** (75 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>, 300 K): δ = 11.93 (7-C), 25.43, 29.24 (18-C, 19-C), 38.49 (2'-C), 40.27 (15-C), 55.80 (17-C), 64.84 (5'-C), 70.25 (3'-C), 83.41 (4'-C), 83.90 (1'-C), 109.80 (5-C), 126.64 (12-C), 127.14 (14-C), 130.13 (11-C), 130.71 (13-C), 132.25 (10-C), 135.90 (6-C), 142.90 (9-C), 150.39 (2-C), 163.63 (4-C), 165.61 (8-C), 172.83 (16-C), 177.32 (20-C) ppm

**ESI(+)-MS (*m/z*):** ber.: 565.37 [C<sub>23</sub>H<sub>25</sub>BrN<sub>4</sub>O<sub>8</sub>]  
gef.: 565.3, 567.5 (Doppelpeak, 1:1) [M+H]<sup>+</sup>, 587.4, 589.2 (Doppelpeak, 1:1), [M+Na]<sup>+</sup>

**HR-ESI(-)-MS (*m/z*):** ber.: 563.0783, 565.0764 (Doppelpeak, 1:1)  
[C<sub>23</sub>H<sub>24</sub>BrN<sub>4</sub>O<sub>8</sub>]<sup>-</sup>  
gef.: 563.0762, 565.0732 (Doppelpeak, 1:1)

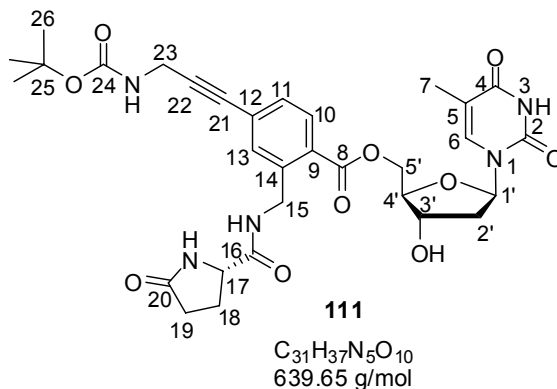
**Analytik des chlorierten Produkts 113:**

**R<sub>F</sub>-Wert:** 0.08 (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH = 90:10)

**<sup>1</sup>H-NMR** (300 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>, 300 K): δ = 7.436 (d, 13-H), 7.487 (dd, 11-H) ppm, die anderen Signale liegen unter den Signalen des Hauptprodukts; *J*<sub>11,13</sub> = 2.3 Hz

**ESI(+)-MS (*m/z*):** ber.: 520.91 [C<sub>23</sub>H<sub>25</sub>ClN<sub>4</sub>O<sub>8</sub>]  
gef.: 521.2, 523.3 (Doppelpeak, 3:1) [M+H]<sup>+</sup>

### 7.3.7 Herstellung von 5'-Amino-*N*-[2-(aminomethyl-*N*-(*S*)-pyroglutamyl)-4-(*tert*-butoxycarbonylamino-prop-2-ynyl)benzoat]-2'-desoxythymidin **111**



Unter inerten Bedingungen werden 916 mg der 85:15-Mischung aus 5'-[2-(Aminomethyl-*N*-(*S*)-pyroglutamyl)-4-bromobenzoat]-2'-desoxythymidin **112** und 5'-[2-(Aminomethyl-*N*-(*S*)-pyroglutamyl)-4-chlorobenzoat]-2'-desoxythymidin **113** (1.64 mmol, 1.0 Äq.) in 15 mL trockenem DMF gelöst, mit 1.13 mL Triethylamin (8.1 mmol, 5.0 Äq.) versetzt und dreimal mittels Gefrier-Entgasung entgast. Nach dem Auftauen werden 63 mg Kupfer(I)iodid (0.32 mmol, 0.2 Äq.) und 189 mg Tetrakis(triphenylphosphan)palladium (0.16 mmol, 0.1 Äq.) zugegeben. Anschließend werden 629 mg des *N*-Boc-geschützten Propargylamins **89** (4.05 mmol, 2.4 Äq.) zugetropft und für fünfeinhalb Stunden bei 80 °C gerührt. Nachdem die RP-HPLC Analyse die Vollständigkeit der Reaktion anzeigte, wird das Lösungsmittel im Ölpumpenvakuum entfernt. Das Rohprodukt wird zunächst über eine Kieselgelfritte (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH = 90:10 bis CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH = 80:20) vorgereinigt und dann mittels Flash-Säulenchromatographie (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> bis CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH = 93:7) aufgereinigt. Es werden 776 mg (75 %) des Safety-Catch-Linkers **111** als leicht gelber Schaum erhalten.

**R<sub>F</sub>-Wert:** 0.07 (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH = 90:10)

**<sup>1</sup>H-NMR** (400 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>, 300 K): δ = 1.398 (s, 26-H<sub>9</sub>), 1.634 (s, 7-H<sub>3</sub>), 1.82-1.92 (m, 18/19-H), 2.05-2.36 (m, 2'-H<sub>2</sub>, 18/19-H<sub>3</sub>), 3.97-4.06 (m, 4'-H, 17-H, 23-H<sub>2</sub>), 4.33-4.39 (m, 3'-H), 4.427 (dd, 5'-H), 4.507 (dd, 5'-H'), 4.54-4.66 (m, 15-H<sub>2</sub>), 5.473 (d, 3'-OH), 6.210 (t, 1'-H), 7.39-7.45 (m, 6-H, 11-H, 13-H, 23-NH), 7.84-7.90 (m, 10-H, 17-NH), 8.386 (t, 15-NH), 11.301 (s, N<sup>3</sup>H) ppm; *J*<sub>5',5''</sub> = 11.9 Hz

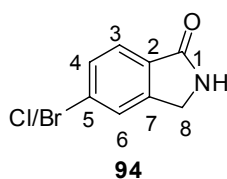
**<sup>13</sup>C-NMR** (100 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>, 300 K): δ = 11.92 (7-C), 25.46, 29.25 (18-C, 19-C), 28.18 (26-C), 30.18 (23-C), 38.51 (2'-C), 40.35 (15-C), 55.77 (17-C), 64.75 (5'-C), 70.25 (3'-C), 78.37 (25-C), 80.61, 90.78 (22-C, 23-C), 83.45 (4'-C), 83.89 (1'-C), 109.79

(5-C), 126.48 (12-C), 127.82, 140.78 (9-C, 14-C), 129.83, 130.58, 130.93 (10-C, 11-C, 13-C), 135.87 (6-C), 150.39 (2-C), 155.29 (24-C), 163.61 (4-C), 135.70 (8-C), 172.72 (16-C), 177.31 (20-C) ppm

**ESI(+)-MS ( $m/z$ ):** ber.: 639.65 [ $C_{31}H_{37}N_5O_{10}$ ]  
gef.: 540.4 [ $M-Boc$ ] $^+$ , 657.8 [ $M+NH_4$ ] $^+$ , 662.6 [ $M+Na$ ] $^+$ , 640.5 [ $M+H$ ] $^+$

**HR-ESI(-)-MS ( $m/z$ ):** ber.: 638.2457 [ $C_{31}H_{36}N_5O_{10}$ ] $^-$   
gef.: 638.2491

### 7.3.8 Herstellung von 5-Bromo/5-Chloro-isoindolin-1-on **94**

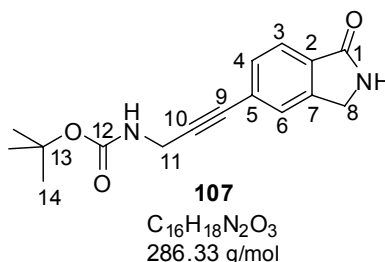


250 mg der 84:16-Mischung aus 5'-(2-Azidomethyl-4-bromobenzoat)-2'-desoxythymidin **99** und 5'-(2-Azidomethyl-4-chlorobenzoat)-2'-desoxythymidin **100** (0.51 mmol, 1.0 Äq.) werden in Methanol gelöst, mit 207 mg Triphenylphosphin (0.78 mmol, 1.5 Äq.) versetzt und eine Stunde zum Rückfluss erhitzt. Anschließend wird das Lösungsmittel im Vakuum entfernt und der Rückstand durch Flash-Säulenchromatographie ( $CH_2Cl_2$  bis  $CH_2Cl_2/MeOH = 98:2$ ) gereinigt. Es werden 110 mg (100 %) der Verbindung **94** als farbloser Feststoff erhalten.

**$R_F$ -Wert:** 0.44 ( $CH_2Cl_2/MeOH = 95:5$ )

**$^1H$ -NMR** (400 MHz,  $DMSO-d_6$ , 300 K):  $\delta = 4.369$  (s, 8- $H_2$ ), 7.47-7.87 (m, 3-H, 4-H, 6-H), 8.649 (s, 8-NH) ppm

### 7.3.9 Herstellung von 5-(*Tert*-butoxycarbonylamino-prop-2-ynyl)-isoindolin-1-on **107**



Unter inerten Bedingungen werden 230 mg 5-Bromo-isoindolin-1-on **94** (1.09 mmol, 1.0 Äq.) in 15 mL trockenem DMF gelöst, mit 0.76 mL Triethylamin (5.45 mmol, 5.0 Äq.) versetzt und dreimal mittels Gefrier-Entgasung entgast. Nach dem Auftauen werden 42 mg Kupfer(I)iodid (0.22 mmol, 0.2 Äq.) und 127 mg Tetrakis(triphenylphosphan)palladium (0.11 mmol, 0.1 Äq.) zugegeben. Anschließend werden 423 mg des *N*-Boc-geschützten Propargylamins **89** (2.73 mmol, 2.5 Äq.) zugetropft und für drei Stunden bei 80 °C gerührt. Das Lösungsmittel wird dann im Ölpumpenvakuum entfernt und der Rückstand in 50 mL Dichlormethan aufgenommen. Die organische Phase wird zweimal mit 5 %iger EDTA-Lösung gewaschen und die wässrige Phase noch zweimal mit 30 mL Dichlormethan rückextrahiert. Die vereinigten organischen Phasen werden über Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> getrocknet und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Das Rohprodukt wird mittels Flash-Säulenchromatographie (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> bis CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH = 98:2) gereinigt und 230 mg (74 %) des Produkts **107** als farbloser Festsstoff erhalten.

**R<sub>F</sub>-Wert:** 0.14 (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH = 95:5)

**Schmp.:** 178-181 °C

**<sup>1</sup>H-NMR** (400 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>, 300 K): δ = 1.403 (s, 14-H<sub>9</sub>), 4.007 (d, 11-H<sub>2</sub>), 4.356 (s, 8-H<sub>2</sub>), 7.381 (br. s, 11-NH), 7.480 (d, 4-H), 7.600 (s, 6-H), 7.639 (d, 3-H), 8.629 (s, 8-NH) ppm, *J*<sub>3,4</sub> = 7.8 Hz

**<sup>13</sup>C-NMR** (100 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>, 300 K): δ = 28.17 (14-C), 30.15 (11-C), 44.71 (8-C), 78.30 (13-C), 81.10, 89.44 (9-C, 10-C), 122.99, 126.57, 130.86 (3-C, 4-C, 6-C), 125.11 (5-C), 132.39, 144.38 (2-C, 7-C), 155.37 (12-C), 169.12 (1-C) ppm

**ESI(+)-MS (*m/z*):** ber.: 286.33 [C<sub>16</sub>H<sub>18</sub>N<sub>2</sub>O<sub>3</sub>]  
gef.: 287.0 [M+H]<sup>+</sup>

**EA (%):** ber.: C: 67.12 H: 6.34 N: 9.78  
gef.: C: 67.00 H: 6.18 N: 9.59

## 7.4 Spaltungs- und Stabilitätsexperimente mit den Safety-Catch-Linkern 81, 82 und 111

Für die Stabilitäts- und Spaltungstests wurden z.T. sehr kleine Mengen verwendet. Diese wurden entweder aus Stammlösungen der Substrate entnommen oder mit Hilfe einer Sartorius Micro M 500 P Mikrowaage abgewogen. Die jeweils verwendete Methode ist in der Durchführungsbeschreibung der einzelnen Experimente genannt.

### 7.4.1 Enzymatische Spaltungsexperimente mit dem Amid-verknüpften Linker 81

Die Spaltungsexperimente wurden mit auf Eupergit C<sup>®</sup> immobilisierter Penicillin G Acylase (EC 3.5.1.11, 124 U/g) durchgeführt. Es wurde 0.05 M, unautoklavierter NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>/Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>-Puffer (PGA-Puffer) mit einem pH-Wert von 7.5 verwendet, sowie Methanol und DMF als Cosolventien. Von dem Substrat **81** wurde pro Ansatz 1 mg verwendet. Um die unterschiedlichen Löslichkeiten der Verbindung **81** in den verwendeten Lösungsmitteln zu berücksichtigen und die Abmessung der kleinen Menge zu erleichtern, wurden dazu zunächst Stammlösungen in den einzelnen Lösungsmittelsystemen hergestellt und dann das entsprechende Volumen entnommen. Die verwendeten Konzentrationen waren bedingt durch die schlechte Löslichkeit unterschiedlich. In der folgenden Tabelle sind die Reaktionsparameter der einzelnen Experimente zusammengefasst.

**Tabelle 7-1:** Reaktionsparameter der Spaltungsexperimente mit dem Safety-Catch-Linker **81**.

#	Edukt	Lösungsmittel <sup>[a]</sup>	Reaktions-volumen [mL]	Konzentration [mM]	Enzym-menge [U]	T [°C]	t [h]
1	<b>81</b>	PGA-Puffer/ MeOH = 7:3	0.7	n.b.	1	37	24
2	<b>81</b>	PGA-Puffer/ DMF = 9:1	1.8	0.62	3	37	48
3	<b>81</b>	PGA-Puffer	3.8	0.26	3	37	48

<sup>[a]</sup>PGA-Puffer = 0.05 M NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>/Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>-Puffer, pH = 7.5.

Für die Inkubation wird ein temperierbarer Schüttelinkubator verwendet. Im Fall der Einträge in Tabelle 7-1, bei denen 3 U des Enzyms verwendet werden (#2, #3), wird zunächst nur 1 U zugegeben und nach 30 Stunden Inkubationszeit weitere 2 U. Die Kontrolle der Reaktionen erfolgt durch analytische RP-HPLC. Dazu werden 50 µL aus

der Reaktionsmischung entnommen. Die Proben werden mit 250  $\mu\text{L}$  Wasser und 250  $\mu\text{L}$  Methanol verdünnt und das Enzym abfiltriert. Es werden dann 150  $\mu\text{L}$  auf die RP-HPLC gegeben und mit der Methode RP-HPLC6 (siehe 7.1.2) analysiert.

#### **7.4.2 Spaltungs- und Stabilitätsexperimente mit dem Ester-verknüpften Linker **82** und Penicillin **G 108****

Vor Durchführung der Stabilitäts- und Spaltungsexperimente wurde die Löslichkeit des Edukts **82** im Millipore Wasser bei 37 °C bestimmt. Dazu werden 10 mg der Verbindung **82** in 5 mL Millipore Wasser bei 37 °C fünf Stunden lang in einem temperierbaren Schüttelinkubator inkubiert. Nach Abfiltration der ungelösten Bestandteile wird die Masse der Lösung bestimmt und das Lösungsmittel anschließend im Vakuum entfernt. Durch die Massenbestimmung des Rückstands kann auf die Löslichkeit geschlossen werden. So erhält man aus 4.4259 g Lösung einen Rückstand von 0.2 mg. Das entspricht einer Löslichkeit bei 37 °C von 0.045 mg/mL.

Die Spaltungsexperimente wurden ebenfalls mit der auf Eupergit C<sup>®</sup> immobilisierten Penicillin G Acylase (EC 3.5.1.11, 124 U/g) durchgeführt. Es wurde 0.05 M, unautoklavierter  $\text{NaH}_2\text{PO}_4/\text{Na}_2\text{HPO}_4$ -Puffer (PGA-Puffer) mit einem pH-Wert von 7.0 verwendet, sowie Methanol als Cosolvenz. Pro Ansatz mit dem Substrat **82** wurden 50  $\mu\text{g}$  verwendet. Die entsprechende Menge wurde aus einer methanolischen Stammlösung entnommen, getrocknet und im jeweiligen Lösungsmittel, entsprechend dem aus dem Löslichkeitsexperiment abgeleiteten Volumen, gelöst. Von Edukt **108** wurden pro Ansatz 6.25 mg verwendet, die aus einer Stammlösung im PGA-Puffer entnommen wurden. In der folgenden Tabelle sind die Reaktionsparameter der einzelnen Experimente zusammengefasst.

**Tabelle 7-2:** Reaktionsparameter der Spaltungs- und Stabilitätsexperimente mit den Substraten **82** und **108**.

#	Edukt	Lösungsmittel <sup>[a]</sup>	Reaktions- volumen [mL]	Konzentration [mM]	Enzym- menge [U]	T [°C]	t [h]
1	<b>82</b>	PGA-Puffer/ MeOH = 8:2	1	0.077	0.24	37	25
2	<b>82</b>	PGA-Puffer/ MeOH = 8:2	1	0.077	-	37	25
3	<b>108</b>	PGA-Puffer/ MeOH = 8:2	0.5	17.5	0.24	37	25
4	<b>82</b>	PGA-Puffer	1	0.077	0.24	37	25
5	<b>82</b>	PGA-Puffer	1	0.077	-	37	25
6	<b>108</b>	PGA-Puffer	0.5	17.5	0.24	37	25

<sup>[a]</sup>PGA-Puffer = 0.05 M NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>/Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>-Puffer, pH = 7.0.

Für die Inkubation wurde ein temperierbarer Schüttelinkubator verwendet. Die Reaktionen wurden mittels analytischer RP-HPLC verfolgt. Im Fall des Edukts **82** wurden dazu 100 µL entnommen, mit 60 µL Wasser und 40 µL Methanol verdünnt und das Enzym abfiltriert. Es wurden dann 100 µL auf die RP-HPLC gegeben und mit der Methode RP-HPLC7 (siehe 7.1.2) analysiert. Im Fall des Edukts **108** wurden 50 µL entnommen, mit 250 µL Wasser und 250 µL Methanol verdünnt und das Enzym abfiltriert. Es wurden dann 50 µL auf die RP-HPLC gegeben und mit der Methode RP-HPLC7 (siehe 7.1.2) analysiert.

### 7.4.3 Stabilitätsexperimente mit dem Ester-verknüpften Safety-Catch-Linker **111**

Vor Durchführung der Stabilitätsexperimente wurde die Löslichkeit des Edukts **82** im Millipore Wasser bei 37 °C bestimmt. Dazu werden 10 mg der Verbindung **82** in 5 mL Millipore Wasser bei 37 °C fünf Stunden lang in einem temperierbaren Schüttelinkubator inkubiert. Nach Abfiltration der ungelösten Bestandteile wird die Masse der Lösung bestimmt und das Lösungsmittel anschließend im Vakuum entfernt. Durch die Massenbestimmung des Rückstands kann auf die Löslichkeit geschlossen werden. So erhält man aus 4.3863 g Lösung einen Rückstand von 0.6 mg. Das entspricht einer Löslichkeit bei 37 °C von 0.137 mg/mL.

Die Stabilität des Ester-verknüpften Linkers **111** wird unter verschiedenen Bedingungen untersucht, die in Tabelle 7-3 zusammengefasst sind.



**Tabelle 7-3:** Reaktionsparameter der Stabilitätsuntersuchungen mit dem Safety-Catch-Linker **111**.

#	Lösungsmittel	pH-Wert	Reaktionsvolumen [mL]	Konzentration [mM]	T [°C]	t
1	Millipore Wasser	7.4	1	0.156	37	24 h
2	PAP-I-Puffer A <sup>[a]</sup>	7.0	1.92	0.156	37	24 h
3	PAP-I-Puffer A <sup>[a]</sup>	6.5	2.26	0.156	37	24 h
4	PAP-I-Puffer A <sup>[a]</sup>	6.0	2.22	0.156	37	24 h
5	PAP-I-Puffer A ohne DTT <sup>[b]</sup>	7.0	2.12	0.156	37	24 h
6	PAP-I-Puffer B <sup>[c]</sup>	7.0	2.94	0.156	37	24 h
7	PAP-I-Puffer B <sup>[c]</sup>	6.5	2.16	0.156	37	24 h
8	0.05 M K <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> in abs. Methanol	> 10	0.5	0.156	RT	1 h
9	1 M TBAF·AcOH in abs. THF	n.b.	1	0.078	RT	4 h
10	0.2 M Et <sub>3</sub> N·3HF in abs. THF	n.b.	1	0.078	RT	4 h
11	10 % DBU in abs. Acetonitril	n.b.	1	0.078	RT	45 Min.
12	0.05 M Beaucage-Reagenz <b>52</b> in ACN	n.b.	0.032	2.44	RT	15 Min.

<sup>[a]</sup>PAP-I-Puffer A = 50 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>/Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 10 mM DTT, 1 mM EDTA. <sup>[b]</sup>PAP-I-Puffer A ohne DTT = 50 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>/Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 1 mM EDTA. <sup>[c]</sup>PAP-I-Puffer B = 50 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>/Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 10 mM TCEP, 1 mM EDTA.

Alle Ansätze wurden in einem Schüttelinkubator bei der angegebenen Temperatur inkubiert. Die Probennahme für die RP-HPLC Analyse ist in den folgenden Abschnitten im Einzelnen beschrieben. Nach der Probennahme wurden die Proben sofort eingefroren und die Lagerung bis zur Analyse erfolgte bei -21 °C.

#### Stabilität in Millipore Wasser, #1:

100 µg werden in 1 mL gelöst, die Stabilität wird durch analytische RP-HPLC nach 24 Stunden Inkubation bei 37 °C kontrolliert. Dazu werden 50 µL des Ansatzes direkt auf die RP-HPLC gegeben und mit der Methode RP-HPLC8 (siehe 7.1.2) analysiert.

#### Stabilitäten in verschiedenen Reaktionspuffern bei verschiedenen pH-Werten, #2-#7:

Es werden Proben in der Größenordnung von 100 µg genau abgewogen und in dem angegebenen Volumen des jeweiligen Puffers gelöst. Daraus erhält man die angegebene Konzentration, die 100 µg des Edukts **111** pro mL entspricht. Zur Stabilitätskontrolle mittels RP-HPLC werden 100 µL der Reaktionslösungen entnommen, mit 100 µL

Methanol verdünnt und 50 µL davon auf die RP-HPLC gegeben. Die verwendete Methode ist wie bei der Stabilitätsbestimmung in Millipore Wasser RP-HPLC8 (siehe 7.1.2). Es wurden Proben nach null, zwei, sechs und 24 Stunden entnommen.

**Stabilität in 0.05 m methanolischer K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, #8:**

Es werden 50 µg der Verbindung **111** eingesetzt, die einer methanolischen Stammlösung (1 mg/mL) entnommen wurden. Nach Trocknung im Vakuum werden sie in 500 µL 0.05 M methanolischer K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> Lösung gelöst. Es werden zu Analyse mittels RP-HPLC 100 µL entnommen und mit weiteren 100 µL Methanol verdünnt. Davon werden 100 µL auf die RP-HPLC gegeben und mit der Methode RP-HPLC9 (siehe 7.1.2) analysiert. Es wurden Proben nach null, zehn und 60 Minuten entnommen.

**Stabilität in verschiedenen Reagenzien für die Oligonukleotidsynthese, #9-#11:**

Für die Ansätze #9-#11 werden ebenfalls 50 µg verwendet, die der methanolischen Stammlösung (1 mg/mL) entnommen werden. Nach Trocknung wird das Edukt **111** in 1 mL des jeweiligen Reagenzes gelöst. Zur Kontrolle mittels RP-HPLC werden 100 µL der Reaktionslösung entnommen, mit weiteren 100 µL Methanol verdünnt und 100 µL davon auf die RP-HPLC gegeben (RP-HPLC9, siehe 7.1.2). Bei den Experimenten #9 und #10 wurde eine Probe zu Beginn (0 h) und eine weitere nach vier Stunden entnommen, bei #11 nach null, fünf und 45 Minuten.

**Stabilität in 0.05 m Beaucage Reagenz (3H-1,2-Benzodithiol-3-on-1,1,-dioxid) **52** in Acetonitril, #12:**

Es werden wie bereits zuvor beschrieben 50 µg aus der methanolischen Stammlösung entnommen, getrocknet und in 32 µL 0.05 M 3H-1,2-Benzodithiol-3-on-1,1,-dioxid **52** in Acetonitril gelöst. Für die RP-HPLC Analyse werden 5 µL der Reaktionsmischung entnommen und mit 245 µL H<sub>2</sub>O/Acetonitril = 8:2 verdünnt. Die Lösung wird filtriert (0.45 µm Spritzenfilter), 100 µL auf die RP-HPLC gegeben und mit der Methode RP-HPLC9 (siehe 7.1.2) analysiert. Es wurden Proben nach null, zwei, fünf und 15 Minuten entnommen.

#### 7.4.4 Mechanistische Untersuchung der spontanen Zyklisierung

Von den beiden Edukten **99/100** (84:16 Gemisch aus Brom- **99** und Chlor-Derivat **100**) und **112/113** (85:15 Gemisch aus Brom- **112** und Chlor-Derivat **113**) werden Lösungen mit Konzentrationen von 0.5 mg/ml in Dichlormethan/MeOH = 1:1 hergestellt. Daraus werden je 200 µL entnommen, getrocknet und anschließend in 900 µL des PAP-I-Puffers A (50 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>/Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 10 mM DTT, 1 mM EDTA) bei pH = 6.5 und 100 µL MeOH gelöst. Die Lösungen werden 18 Stunden bei 37 °C in einem temperierbaren Schüttelinkubator inkubiert. Das Lösungsmittel wird dann durch Lyophilisierung entfernt, der Rückstand in 300 µL Methanol gelöst und die beiden Reaktionsansätze durch RP-HPLC analysiert (Methode: RP-HPLC10). Dabei werden die einzelnen Fraktionen gesammelt und mittels ESI-Massenspektroskopie identifiziert.

#### 7.4.5 Enzymatische Spaltungsexperimente mit dem Ester-verknüpften Linker **111** und Pyroglutamyl-4-nitroanilid **120**

Vor der Aufnahme der Kalibrierkurven und der Durchführung der Spaltungsexperimente wurden vom Edukt **111** und Produkt **107** UV-Spektren aufgenommen, um die Absorptionsmaxima der beiden Verbindungen zu bestimmen und die Detektionswellenlänge der RP-HPLC Methode anzupassen.

Bestimmte Absorptionsmaxima:  $\lambda_{\max}$  **111** = 266 nm

$\lambda_{\max}$  **107** = 265 nm.

Die Detektionswellenlänge der verwendeten RP-HPLC Methode (RP-HPLC10, siehe 7.1.2) wurde von 254 nm auf 265 nm erhöht.

##### 7.4.5.1 Aufnahme der Kalibrierkurven für das Edukt **111** und das Produkt **107**

Die Kalibrierkurven wurden in einem 8:2 Gemisch aus Millipore Wasser und Methanol aufgenommen. Die Verdünnungsreihen wurden aus Stammlösungen (1 mg/mL) hergestellt. Dazu wurden daraus zunächst zehnfach verdünnte Konzentrationen (100 µg/mL) hergestellt. Das entspricht 200 % der Startkonzentration an Verbindung **111** in den Spaltungsexperimenten. Daraus wurden dann Verdünnungsreihen für beide Verbindungen **111** und **107** hergestellt, die mittels RP-HPLC vermessen und über die

Bestimmung der Flächen der Signale ausgewertet wurden. Jede Punkt wurde durch eine Doppelbestimmung beginnend bei der niedrigsten Konzentration bestimmt. Dazu wurden 100 µL der entsprechenden Lösungen auf die RP-HPLC gegeben und mit der angegebenen Methode analysiert. In Tabelle 7-4 und Tabelle 7-5 sind die Konzentrationen der Verdünnungsreihen und die daraus resultierenden Flächen mit Standardabweichung aufgelistet.

**Tabelle 7-4:** Gemessene Punkte der Kalibrierkurve für Verbindung 111.

#	Konzentration [µg/mL]	Fläche	Mittelwert der bestimmten Flächen	Standard- abweichung [%]	HPLC- Methode
1	75.0	247.5 236.6	242.1	3.2	RP-HPLC10
2	50.0	131.2 130.4	130.8	0.4	RP-HPLC10
3	37.5	104.3 102.9	103.6	1.0	RP-HPLC10
4	25.0	83.2 84.7	85.1	1.3	RP-HPLC10
5	12.5	45.8 45.0	44.0	1.2	RP-HPLC10
6	5.0	19.7 19.4	19.55	1.1	RP-HPLC10

**Tabelle 7-5:** Gemessene Punkte der Kalibrierkurve für Verbindung 107.

#	Konzentration [µg/mL]	Fläche	Mittelwert der bestimmten Flächen	Standard- abweichung [%]	HPLC- Methode
1	75.0	277.9 272.9	275.4	1.3	RP-HPLC10
2	50.0	191.2 192.4	191.8	0.4	RP-HPLC10
3	37.5	141.3 143.7	142.5	1.2	RP-HPLC10
4	25.0	94.7 95.8	95.3	0.8	RP-HPLC10
5	12.5	48.0 48.4	48.2	0.6	RP-HPLC10
6	5.0	20.8 24.8	22.8	12.4	RP-HPLC10

### 7.4.5.2 Durchführung der enzymatischen Spaltungsexperimente

Bei der Durchführung der Spaltungsexperimente mit dem Safety-Catch-Linker **111** und der Referenzsubstanz **120** wurde unter sterilen Bedingungen gearbeitet. Als Enzym wurde rekombinante *Pyrococcus furiosus* Pyroglutamyl Aminopeptidase aus *Escherichia coli* von Takara Bio Inc., Japan verwendet. Es wurde ein autoklavierter Puffer aus 50 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>/Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 10 mM DTT und 1 mM EDTA bei pH = 7.4 und pH = 6.5 eingesetzt.

Von dem Substrat **111** werden 50 µg aus einer methanolischen Stammlösung (1 mg/mL) entnommen, getrocknet und in 1000 µL des entsprechenden Puffers gelöst. Vor der Zugabe des Enzyms werden 100 µL zur Bestimmung der Startkonzentration entnommen. Für jeden Ansatz werden 0.01 U des Enzyms in 50 µL des jeweiligen Puffers rekonstituiert und 25 µL (= 5 mU) zu der Lösung des Substrats zugegeben. Die Kontrollexperimente mit Safety-Catch-Linker **111** ohne Enzym werden außer der Zugabe des Enzyms analog angesetzt (50 µg in 1 mL Puffer). Alle Ansätze werden in einem temperierbaren Schüttelinkubator bei 37 °C für die in Tabelle 7-6 angegebene Zeit inkubiert. Der Kontrollansatz mit dem Referenzsubstrat Pyroglutamyl-4-nitroanilid **120** diene der generellen Überprüfung der Enzymaktivität. Dazu wird 1 mg der Substanz in 480 µL des Puffers bei pH = 6.5 gelöst und mit 20 µL des rekonstituierten Enzyms (= 4 mU) versetzt. Alle Reaktionsparameter sind in Tabelle 7-6 zusammengefasst.

**Tabelle 7-6:** Reaktionsparameter der Stabilitäts- und Spaltungsexperimente mit den Substraten **111** und **120**.

#	Edukt	Puffer <sup>[a]</sup>	pH-Wert	Reaktionsvolumen [mL]	Konzentration [mM]/[µg/mL]	Enzymmenge [mU]	T [°C]	t [h]
1	<b>111</b>	PAP-I-Puffer A	7.4	1	0.078/50	5	37	1
2	<b>111</b>	PAP-I-Puffer A	7.4	1	0.078/50	-	37	6
3	<b>111</b>	PAP-I-Puffer A	6.5	1	0.078/50	5	37	22
4	<b>111</b>	PAP-I-Puffer A	6.5	1	0.078/50	-	37	22
5	<b>120</b>	PAP-I-Puffer A	6.5	0.5	8/2000	4	37	24

<sup>[a]</sup>PAP-I-Puffer A = 50 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>/Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 10 mM DTT, 1 mM EDTA.

Zur Kontrolle der Reaktionen mit dem Safety-Catch-Linker **111** werden Proben von 100 µL aus der Reaktionsmischung entnommen, mit 60 µL Millipore Wasser und 40 µL Methanol verdünnt und davon 100 µL auf die RP-HPLC gegeben. Die verwendete

Methode ist wie bei der Aufnahme der Kalibrierkurven RP-HPLC10 mit Detektion bei 265 nm. Die erste Probennahme erfolgt sofort nach Zugabe des Enzyms und wird auch sofort mittels RP-HPLC analysiert. Ansonsten werden die Reaktion nach der Probennahme durch sofortiges Einfrieren gestoppt und die Proben bei -21 °C bis zur RP-HPLC Analyse gelagert. Mit Hilfe der bestimmten Kalibrierkurve werden die RP-HPLC Chromatogramme quantitativ ausgewertet. Dabei muss die angegebene Fläche aufgrund der halbierten Konzentration der applizierten Proben im Vergleich zur Kalibrierkurve noch mal zwei genommen werden. In Tabelle 7-7 sind die Ergebnisse dieser Auswertung aufgelistet. Es sind die Daten für das Edukt **111**, das Zyklierungsprodukt **107** und das Zwischenprodukt (freies Amin) **119** angegeben.

**Tabelle 7-7:** Quantitative Auswertung der Spaltungs- und der Stabilitätsexperimente mit Verbindung **111**.

Experiment #1 aus Tabelle 7-6			
Zeit [h]	0	0.5	1
Fläche Edukt <b>111</b>	54.9	2.5	0
Konzentration Edukt <b>111</b> [µg/mL]	39.5	1.6	0
Anteil Edukt <b>111</b> [%]	100	5	0
Fläche Produkt <b>107</b>	3.1	62.6	63.0
Konzentration Produkt <b>107</b> [µg/mL]	1.8	33.4	33.7
Anteil Produkt <b>107</b> [%]	0	93	94
Fläche freies Amin <b>119</b>	0	2.8	0
Anteil freies Amin <b>119</b> [%] <sup>[a]</sup>	0	7	0

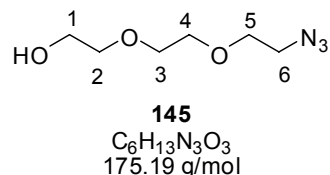
Experiment #2 aus Tabelle 7-6						
Zeit [h]	0	0.5	1	2	4	6
Fläche Edukt <b>111</b>	73.5	60.3	52.7	31.3	10.4	6.8
Konzentration Edukt <b>111</b> [µg/mL]	48.0	39.4	34.4	20.5	6.8	4.4
Anteil Edukt <b>111</b> [%]	100	82	72	43	14	9
Fläche Produkt <b>107</b>	6.6	6.4	19.5	21.6	39.4	46.7
Konzentration Produkt <b>107</b> [µg/mL]	3.5	3.4	10.4	11.5	21.0	24.9
Anteil Produkt <b>107</b> [%]	0	7	22	24	44	52

Experiment #3 aus Tabelle 7-6								
Zeit [h]	0	0.5 <sup>[b]</sup>	1	2	4	6	8	22
Fläche Edukt 111	58.1	2.9	0	0	0	0	0	0
Konzentration Edukt 111 [µg/mL]	42.2	2.1	0	0	0	0	0	0
Anteil Edukt 111 [%]	100	5	0	0	0	0	0	0
Fläche Produkt 107	4.4	-	12.8	25.9	36.3	46.6	64.4	73
Konzentration Produkt 107 [µg/mL]	2.6	-	6.8	13.8	19.4	24.9	34.4	39.0
Anteil Produkt 107 [%]	0	-	16	33	46	59	82	93
Fläche freies Amin 119	0	57.8	56.3	44.0	23.2	15.7	8.0	0
Anteil freies Amin 119 [%] <sup>[a]</sup>	0	-	84	67	54	41	18	0
Experiment #4 aus Tabelle 7-6								
Zeit [h]	0	-	1	2	4	6	8	22
Fläche Edukt 111	75.9	-	77.8	74.3	56.4	60.7	48.5	33.0
Konzentration Edukt 111 [µg/mL]	49.6	-	50.9	48.6	36.9	39.7	31.7	21.6
Anteil Edukt 111 [%]	100	-	103	98	74	80	64	43
Fläche Produkt 107	3.1	-	3.3	4.2	16.8	18.9	9.2	23.1
Konzentration Produkt 107 [µg/mL]	1.7	-	1.8	2.2	9.0	10.1	4.9	12.3
Anteil Produkt 107 %	0	-	4	5	18	20	10	25

<sup>[a]</sup>Der Anteil des freien Amins **119** wurde aus der Differenz des Anteils des Edukts und des Produkts bestimmt. <sup>[b]</sup>Der Peak des Produkts in dem RP-HPLC Chromatogramm von Experiment #1 nach 0.5 Stunden konnte nicht integriert und die Fläche nicht bestimmt werden. Es liegt daher auch kein prozentualer Wert für das Zwischenprodukt vor.

## 7.5 Synthese des Fluorid-spaltbaren Linkers 148 und der Modellverbindung 147

### 7.5.1 Herstellung von 2-[2-(2-Azidoethoxy)ethoxy]ethanol 145



Der Literatur<sup>[353]</sup> folgend werden 10.0 g 2-(2-(2-Chloroethoxy)ethoxy)ethanol **146** (56.9 mmol, 1.0 Äq.) in 50 mL reinem Ethanol gelöst. Zu der Lösung werden 1.7 g Natriumiodid (11.9 mmol, 0.2 Äq.) und 11.1 g Natriumazid (170.8 mmol, 3.0 Äq.) gegeben und vier Tage auf 78 °C erhitzt. Die Reaktionsmischung wird dann abfiltriert und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Der Rückstand wird in 100 mL Dichlormethan/Diethylether = 1:1 aufgenommen und 20 Stunden bei 4 °C stehen gelassen. Der Niederschlag wird abfiltriert und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Das leicht gelbliche Öl wird durch eine fraktionierte Vakuumdestillation gereinigt. Es werden 9.2 g (92 %, Literatur: 62 %<sup>[353]</sup>) **145** als farbloses Öl erhalten.

**R<sub>F</sub>-Wert:** 0.08 (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH = 90:10)

**Siedep.:** 76-80 °C bei 0.8 mbar

**<sup>1</sup>H-NMR** (250 MHz, CDCl<sub>3</sub>, 300 K): δ = 2.747 (s, OH), 3.457 (,t", 6-H<sub>2</sub>), 3.63-3.79 (m, 1-H<sub>2</sub>, 2-H<sub>2</sub>, 3-H<sub>2</sub>, 4-H<sub>2</sub>, 5-H<sub>2</sub>) ppm

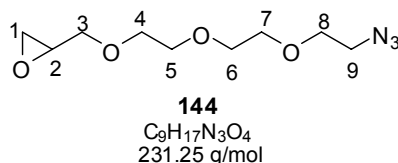
**<sup>13</sup>C-NMR** (63 MHz, CDCl<sub>3</sub>, 300 K): δ = 50.77 (6-C), 61.51 (1-C), 69.92, 70.18, 70.58, 72.43 (2-C, 3-C, 4-C, 5-C) ppm

**FT-IR (NaCl):** ν = 3550-3200 (s, O-H), 2900 (s, -CH<sub>2</sub>), 2110 (s, -N<sub>3</sub>) cm<sup>-1</sup>

**ESI(+)-MS (m/z):**  
ber.: 175.19 [C<sub>6</sub>H<sub>13</sub>N<sub>3</sub>O<sub>3</sub>]  
gef.: 197.7 [M+Na]<sup>+</sup>, 175.8 [M]<sup>+</sup>



### 7.5.2 Herstellung von 2-{2-[2-(2-Azidoethoxy)ethoxy]ethoxy-methyl}oxirane **144**



In Anlehnung an die Literatur<sup>[363]</sup> wird unter inerten Bedingungen zu einer Suspension von 0.15 g Natriumhydrid (6.3 mmol, 1.1 Äq.) in 6 mL trockenem THF 1.00 g des Alkohols **145** (5.7 mmol, 1.0 Äq.) tropfenweise zugegeben und zwei Stunden bis zur Beendigung der Gasentwicklung bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend werden 2.3 mL (±)-Epichlorohydrin (28.5 mmol, 5.0 Äq.) zugetropft und die Reaktionsmischung 16 Stunden bei Raumtemperatur gerührt. Die Lösung wird dann mit 30 %iger methanolischer H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> neutralisiert und in 40 mL gesättigte NaCl-Lösung gegossen. Die Phasen werden getrennt und die wässrige Phase noch zweimal mit 30 mL Ethylacetat und zweimal mit 30 mL Dichlormethan extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen werden über Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> getrocknet und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Der ölige Rückstand wird durch Flash-Säulenchromatographie (*n*Hexan/Diethylether = 1:2 + 1 % NH<sub>3</sub> bis *n*Hexan/Diethylether = 1:5 + 1 % NH<sub>3</sub>) aufgereinigt und man erhält 884 mg (67 %) der Verbindung **144** als farbloses Öl.

**R<sub>F</sub>-Wert:** 0.13 (*n*Hex/Et<sub>2</sub>O/NH<sub>3</sub> = 1:2:0.03)

**<sup>1</sup>H-NMR** (400 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>, 300 K): δ = 2.540 (dd, 1-H), 2.724 (dd, 1-H'), 3.07-3.11 (m, 2-H), 3.268 (dd, 3-H), 3.395 (,t'', 9-H<sub>2</sub>), 3.52-3.63 (m, 4-H<sub>2</sub>, 5-H<sub>2</sub>, 6-H<sub>2</sub>, 7-H<sub>2</sub>, 8-H<sub>2</sub>), 3.714 (dd, 3-H') ppm; *J*<sub>1,1'</sub> = 5.1 Hz, *J*<sub>1,3</sub> = 2.7 Hz, *J*<sub>3,3'</sub> = 11.6 Hz

**<sup>13</sup>C-NMR** (100 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>, 300 K): δ = 43.39 (1-C), 50.03 (9-C), 50.29 (2-C), 69.27, 69.72, 69.82, 69.84, 69.97 (4-C, 5-C, 6-C, 7-C, 8-C), 71.53 (3-C) ppm

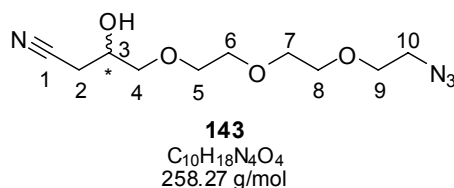
**FT-IR (NaCl):** ν = 3050 (m, Epoxid C-H), 2900 (s, -CH<sub>2</sub>), 2120 (s, -N<sub>3</sub>) cm<sup>-1</sup>

**MALDI(+)-MS (*m/z*):** ber.: 231.25 [C<sub>9</sub>H<sub>17</sub>N<sub>3</sub>O<sub>4</sub>]  
gef.: 205.17 [M-N<sub>2</sub>+2H]<sup>+</sup>

**ESI(+)-MS (*m/z*):** ber.: 231.25 [C<sub>9</sub>H<sub>17</sub>N<sub>3</sub>O<sub>4</sub>]  
gef.: 254.0 [M+Na]<sup>+</sup>, 249.0 [M+H<sub>2</sub>O]<sup>+</sup>, 232.0 [M]<sup>+</sup>

**EA (%):** ber.: C: 46.74 H: 7.41 N: 18.17  
gef.: C: 46.52 H: 7.37 N: 18.45

### 7.5.3 Herstellung von 4-{2-[2-(2-Aminoethoxy)ethoxy]-ethoxy}-3-hydroxybutyronitrile **143**



In Anlehnung an die Literatur<sup>[364]</sup> werden zu einer Lösung aus 500 mg der Verbindung **144** (2.16 mmol, 1.0 Äq.) in 2 mL Ethanol 10 mL demineralisiertes Wasser gegeben und fünf Minuten stark gerührt. Es werden dann 153 mg Natriumcyanid (3.03 mmol, 1.4 Äq.) zugegeben und 16 Stunden bei Raumtemperatur gerührt. Die Reaktionslösung wird dann im Vakuum auf die Hälfte des Volumens eingengt, zweimal mit je 20 mL Ethylacetat und einmal mit 20 mL Dichlormethan extrahiert, über Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> getrocknet und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Der ölige Rückstand wird mittels Flash-Säulenchromatographie (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH = 97:3) gereinigt und man erhält 498 mg (89 %) des Alkohols **143** als farbloses Öl.

**R<sub>F</sub>-Wert:** 0.37 (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH = 95:5)

**<sup>1</sup>H-NMR** (400 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>, 300 K): δ = 2.532 (dd, 2-H), 2.655 (dd, 2-H'), 3.321 (dd, 4-H), 3.382 (s, t<sup>c</sup>, 10-H<sub>2</sub>), 3.404 (dd, 4-H'), 3.52-3.62 (m, 5-H<sub>2</sub>, 6-H<sub>2</sub>, 7-H<sub>2</sub>, 8-H<sub>2</sub>, 9-H<sub>2</sub>), 3.872 (m, 3-H), 5.455 (d, OH) ppm; *J*<sub>2,2'</sub> = 16.9 Hz, *J*<sub>4,4'</sub> = 10.0 Hz

**<sup>13</sup>C-NMR** (100 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>, 300 K): δ = 22.52 (2-C), 49.99 (10-C), 65.24 (3-C), 69.27, 69.70, 69.71, 69.83, 70.14 (5-C, 6-C, 7-C, 8-C, 9-C), 73.37 (4-C), 118.86 (1-C) ppm

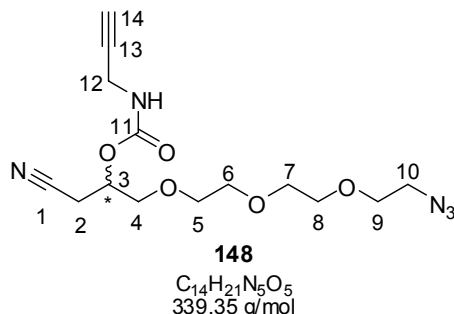
**FT-IR (NaCl):** ν = 3520-3300 (s, O-H), 2900 (s, -CH<sub>2</sub>), 2250 (m, -C≡N), 2108 (s, -N<sub>3</sub>) cm<sup>-1</sup>

**MALDI(+)-MS (*m/z*):** ber.: 258.27 [C<sub>10</sub>H<sub>18</sub>N<sub>4</sub>O<sub>4</sub>]  
gef.: 234.15 [M-N<sub>2</sub>+4 oder M-CN+2]<sup>+</sup>

**ESI(+)-MS (*m/z*):** ber.: 258.27 [C<sub>10</sub>H<sub>18</sub>N<sub>4</sub>O<sub>4</sub>]  
gef.: 280.9 [M+Na]<sup>+</sup>, 275.9 [M+NH<sub>4</sub>]<sup>+</sup>, 299.9 [M+K]<sup>+</sup>

**EA (%):** ber.: C: 46.26 H: 7.18 N: 21.81  
gef.: C: 46.50 H: 7.02 N: 21.69

### 7.5.4 Herstellung von Prop-2-ynyl-carbaminsäure-1-{2-[2-(2-azidoethoxy)ethoxy]ethoxymethyl}-2-cyanoethylester **148**



Unter inerten Bedingungen werden 130 mg des sekundären Alkohols **143** (0.5 mmol, 1.0 Äq.) in 10 mL trockenem Acetonitril gelöst, die Lösung auf 0 °C gekühlt, 70 mg wasserfreies K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (0.5 mmol, 1.0 Äq.) zugegeben und zwei Stunden bei 0 °C gerührt. Es werden dann 190 mg Di(*N*-succinimidyl)carbonat (0.7 mmol, 1.4 Äq.) mit weiteren 5 mL trockenem Acetonitril zugegeben und die Suspension 20 Stunden bei 0 °C gerührt. Anschließend werden 72 µL Propargylamin **150** (1.1 mmol, 2.2 Äq.) zugetropft und zunächst eine Stunde bei 0 °C und dann zwei Stunden bei Raumtemperatur gerührt. Das Lösungsmittel wird im Vakuum entfernt und der Rückstand in 20 mL gesättigter NaHCO<sub>3</sub>-Lösung und 20 mL Dichlormethan aufgenommen. Die organische Phase wird noch mal mit 20 ml gesättigter NaHCO<sub>3</sub>-Lösung und 20 mL gesättigter NH<sub>4</sub>Cl-Lösung gewaschen. Die vereinigten wässrigen Phasen werden noch zweimal mit 20 mL Dichlormethan rückextrahiert, die vereinigten organischen Phasen über Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> getrocknet und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Die Reinigung des Rohprodukts erfolgt durch eine Flash-Säulenchromatographie (*n*Hexan + 1 % EtMe<sub>2</sub>N bis *n*Hexan/Essigester = 1:1 + 1 % EtMe<sub>2</sub>N) und es werden 129 mg (76 %) der Verbindung **148** als leicht gelbes Öl erhalten.

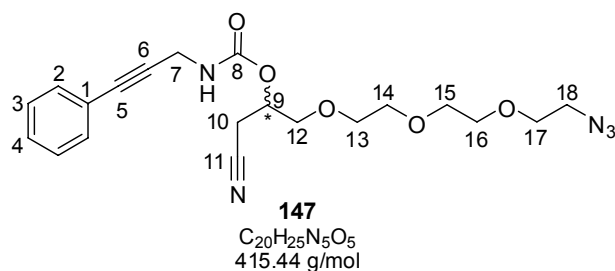
**R<sub>F</sub>-Wert:** 0.27 (*n*Hex/EtOAc = 1:2)

**<sup>1</sup>H-NMR** (400 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>, 300 K): δ = 2.832 (dd, 2-H), 2.900 (dd, 2-H'), 3.120 (t, 14-H), 3.390 (t, 10-H<sub>2</sub>), 3.50-3.62 (m, 4-H<sub>2</sub>, 5-H<sub>2</sub>, 6-H<sub>2</sub>, 7-H<sub>2</sub>, 8-H<sub>2</sub>, 9-H<sub>2</sub>), 3.782 (dd, 12-H<sub>2</sub>), 4.947 („Quintett“, 3-H), 7.891 (t, NH) ppm, *J*<sub>2,2'</sub> = 17.2 Hz, *J*<sub>12,NH</sub> = 5.7 Hz, *J*<sub>12,14'</sub> = 2.4 Hz

**<sup>13</sup>C-NMR** (100 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>, 300 K): δ = 19.72 (2-C), 29.82 (12-C), 50.00 (10-C), 67.89 (3-C), 69.26, 69.67, 69.69, 69.83, 70.20, 70.32 (4-C, 5-C, 6-C, 7-C, 8-C, 9-C), 73.17 (14-C), 81.08 (13-C), 117.70 (1-C), 154.88 (11-C) ppm

<b>FT-IR (NaCl):</b>	$\nu = 3297$ (s br., -N-H, $\equiv$ C-H), $2900$ (s br., -CH <sub>2</sub> ), $2252$ (m, -C $\equiv$ N), $2108$ (s, -N <sub>3</sub> ), $1730$ (s, -C=O) cm <sup>-1</sup>
<b>MALDI(+)-MS (<i>m/z</i>):</b>	ber.: $339.35$ [C <sub>14</sub> H <sub>21</sub> N <sub>5</sub> O <sub>5</sub> ] gef.: $362.16$ [M+Na] <sup>+</sup> , $339.97$ [M+H] <sup>+</sup>
<b>ESI(+)-MS (<i>m/z</i>):</b>	ber.: $339.35$ [C <sub>14</sub> H <sub>21</sub> N <sub>5</sub> O <sub>5</sub> ] gef.: $362.0$ [M+Na] <sup>+</sup> , $357.0$ [M+NH <sub>4</sub> ] <sup>+</sup> , $340.0$ [M] <sup>+</sup> , $679.3$ [2M] <sup>+</sup>
<b>EA (%):</b>	ber.: C: 49.55    H: 6.24    N: 20.64 gef.: C: 49.68    H: 6.30    N: 20.78

### 7.5.5 Herstellung von (3-Phenyl-prop-2-ynyl)carbaminsäure-1-{2-[2-(2-azidoethoxy)ethoxy]ethoxymethyl}-2-cyanoethylester **147**



Unter inerten Bedingungen werden 300 mg Iodbenzol **149** (1.44 mmol, 1.00 Äq.) in 7 mL trockenem Dichlormethan gelöst und mittels Gefrier-Entgasung entgast. Anschließend werden 28 mg Kupfer(I)iodid (0.14 mmol, 0.10 Äq.), 84 mg Tetrakis(triphenylphosphan)palladium (0.07 mmol, 0.05 Äq.) zugegeben und der Kolben mit Hilfe von Aluminiumfolie abgedunkelt. Es werden dann 572 mg des Alkins **148** (11.69 mmol, 1.17 Äq.) in zwei Portionen zugetropft. Die erste Hälfte wird direkt zugegeben, die andere Hälfte nach einer Stunde Rühren bei Raumtemperatur. Nach weitem zweieinhalb Stunden Rühren bei Raumtemperatur werden 20 mL Dichlormethan zugegeben und zweimal mit 50 mL 5 %iger EDTA-Lösung und einmal mit 50 mL gesättigter NaHCO<sub>3</sub>-Lösung gewaschen. Die organische Phase wird über Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> getrocknet und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Das Rohprodukt wird durch eine Flash-Säulenchromatographie gereinigt (*n*Hexan + 1 % EtMe<sub>2</sub>N bis *n*Hexan/Essigester = 1:1 + 1 % EtMe<sub>2</sub>N) und 549 mg (92 %) des Produkts **147** als gelbes Öl erhalten.

**R<sub>F</sub>-Wert:** 0.18 (*n*Hex/EtOAc/EtMe<sub>2</sub>N = 1:1:0.02)

**$^1\text{H-NMR}$**  (300 MHz,  $\text{DMSO-d}_6$ , 300 K):  $\delta$  = 2.80-2.96 (m, 10- $\text{H}_2$ ), 3.379 („t“, 18- $\text{H}_2$ ), 3.51-3.62 (m, 12- $\text{H}_2$ , 13- $\text{H}_2$ , 14- $\text{H}_2$ , 15- $\text{H}_2$ , 16- $\text{H}_2$ , 17- $\text{H}_2$ ), 4.064 (d, 7- $\text{H}_2$ ), 4.988 („Quintett“, 9-H), 7.34-7.44 (m, 2- $\text{H}_2$ , 3- $\text{H}_2$ , 4-H), 7.964 (t, NH) ppm;  $J_{7,\text{NH}} = 5.7$  Hz

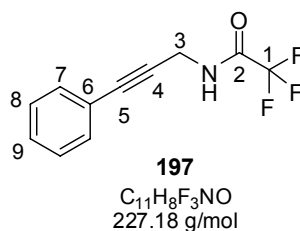
**$^{13}\text{C-NMR}$**  (75 MHz,  $\text{DMSO-d}_6$ , 300 K):  $\delta$  = 19.70 (10-C), 30.57 (7-C), 49.98 (18-C), 67.88 (9-C), 69.21, 69.65, 69.66, 69.79, 70.19, 70.33 (12-C, 13-C, 14-C, 15-C, 16-C, 17-C), 81.79 (5-C), 86.89 (6-C), 117.70 (11-C), 122.22 (4-C), 128.47, 128.57, 131.28 (1-C, 2-C, 3-C), 154.90 (8-C) ppm

**FT-IR** (NaCl):  $\nu$  = 3332 (s br., -N-H), 3056 (m, C-H arom.), 2872 (s br., - $\text{CH}_2$ ), 2251 (m, - $\text{C}\equiv\text{N}$ , - $\text{C}\equiv\text{C}$ -), 2108 (s, - $\text{N}_3$ ), 1730 (s, -C=O)  $\text{cm}^{-1}$

**MALDI(+)-MS ( $m/z$ ):** ber.: 415.44 [ $\text{C}_{20}\text{H}_{25}\text{N}_5\text{O}_5$ ]  
gef.: 439.83 [ $\text{M}+\text{Na}+\text{H}$ ] $^+$ , 413.15 [ $\text{M}-\text{N}_2+\text{Na}+3\text{H}$ ] $^{2+}$ ,  
391.34 [ $\text{M}-\text{N}_2+4\text{H}$ ] $^{2+}$

**EA (%)**: ber.: C: 57.82 H: 6.07 N: 16.86  
gef.: C: 58.04 H: 6.01 N: 16.92

### 7.5.6 Herstellung von 2,2,2-Trifluoro-*N*-(3-phenyl-prop-2-ynyl)-acetamid **197**



Unter inerten Bedingungen wird eine Mischung aus 90 mL trockenem Dichlormethan und 36 mL Triethylamin durch mehrmaliges, kurzes Anlegen von Vakuum und Belüften mit Argon entgast. Es werden dann 0.09 g Kupfer(I)iodid (0.48 mmol, 0.02 Äq.), 0.28 g Tetrakis(triphenylphosphan)palladium (0.24 mmol, 0.01 Äq.) und 5.00 g Iodbenzol **149** (24.02 mmol, 1.00 Äq.) zugegeben und der Kolben mit Alufolie abgedunkelt. 5.44 g (36.03 mmol, 1.50 Äq.) Trifluoracetat geschütztes Propargylamin **153** werden dann innerhalb einer halben Stunde zugetropft und die Lösung 16 Stunden bei Raumtemperatur gerührt. Zur Aufarbeitung wird zunächst zweimal mit 60 mL 5 %iger EDTA-Lösung und dann einmal mit 50 mL gesättigter  $\text{NaHCO}_3$ -Lösung gewaschen. Die vereinigten wässrigen Phasen werden zweimal mit 60 mL Dichlormethan rückextrahiert. Die vereinigten organischen Phasen werden über  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  getrocknet und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Die Aufreinigung wird mittels

einer Kieselgelfritte durchgeführt (Laufmittel: CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>). Es werden 5.3 g (97 %) der Verbindung **197** als orangegelber Feststoff erhalten.

**R<sub>F</sub>-Wert:** 0.50 (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH = 98:2)

**Schmp.:** 74 °C

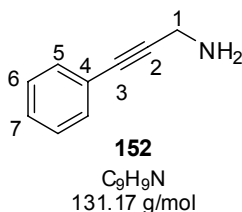
**<sup>1</sup>H-NMR** (250 MHz, CDCl<sub>3</sub>, 300 K): δ = 4.394 (d, 3-H<sub>2</sub>), 6.552 (br. s, NH), 7.28-7.47 (m, 7-H<sub>2</sub>, 8-H<sub>2</sub>, 9-H) ppm

**<sup>13</sup>C-NMR** (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>, 300 K): δ = 30.71 (3-C), 82.31 (5-C), 84.94 (4-C), 115.81 (q, 1-C), 121.99 (6-C), 128.53 (9-C), 129.03 (8-C), 131.92 (7-C), 156.99 (q, 2-C) ppm; *J*<sub>1-C,F</sub> = 287.4 Hz, *J*<sub>2-C,F</sub> = 37.3 Hz

**ESI(+)-MS (*m/z*):** ber.: 227.18 [C<sub>11</sub>H<sub>8</sub>F<sub>3</sub>NO]  
gef.: 227.7 [M]<sup>+</sup>, 244.8 [M+NH<sub>4</sub>]<sup>+</sup>, 249.9 [M+Na]<sup>+</sup>

**EA (%):** ber.: C: 58.15 H: 3.55 N: 6.17  
gef.: C: 58.08 H: 3.59 N: 6.06

## 7.5.7 Herstellung von 3-Phenyl-prop-2-inylamin **152**



Das Trifluoracetat geschützte Amin **197** (4.73 g, 20.82 mmol, 1.0 Äq.) wird in 240 mL Methanol und 15 mL demineralisiertem Wasser gelöst, mit 3.34 g K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (23.94 mmol, 1.15 Äq.) versetzt und zwei Stunden zum Rückfluss erhitzt. Anschließend wird das Lösungsmittel im Vakuum entfernt, der Rückstand in 75 mL demineralisiertem Wasser aufgenommen und mit 1 M HCl neutralisiert. Die wässrige Phase wird viermal mit 50 mL Dichlormethan extrahiert, die vereinigten organischen Phasen über Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> getrocknet und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Das Rohprodukt wird durch eine Destillation aufgereinigt und 1.95 g (72 %) des Produkts **152** als gelbes Öl erhalten.

**R<sub>F</sub>-Wert:** 0.29 (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH/NH<sub>3</sub> = 95:5:0.5)

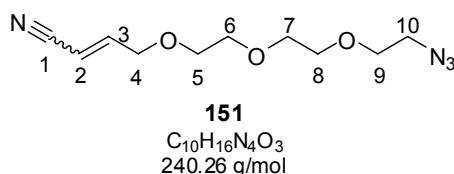
**Siedep.:** 67-71 °C (1.8 mbar) (Literatur: 65-66 °C (0.5 mbar)<sup>[365]</sup>)

**$^1\text{H}$ -NMR** (250 MHz,  $\text{CDCl}_3$ , 300 K):  $\delta$  = 1.476 (br. s,  $\text{NH}_2$ ), 3.646 (s, 1- $\text{H}_2$ ), 7.27-7.33 (m, 6- $\text{H}_2$ , 7- $\text{H}$ ), 7.37-7.45 (m, 5- $\text{H}_2$ ) ppm

**$^{13}\text{C}$ -NMR** (75 MHz,  $\text{CDCl}_3$ , 300 K):  $\delta$  = 32.34 (1-C), 82.55 (3-C), 90.36 (2-C), 123.38 (4-C), 128.13, 128.38, 131.67 (5-C, 6-C, 7-C) ppm

**ESI(+)-MS ( $m/z$ ):**  
ber.: 131.17 [ $\text{C}_9\text{H}_9\text{N}$ ]  
gef.: 131.8 [ $\text{M}$ ]<sup>+</sup>

### 7.5.8 Herstellung von (*E/Z*)-4-{2-[2-(2-Azidoethoxy)ethoxy]ethoxy}-but-2-en-nitril **151**



#### Als Nebenprodukt bei der Aktivierung der OH-Gruppe von **143** mit $\text{Et}_3\text{N}$ :

In Anlehnung an eine Literaturvorschrift<sup>[244]</sup> werden 250 mg des sekundäre Alkohols **143** (0.97 mmol, 1.0 Äq.) unter inerten Bedingungen in 12 mL trockenem Acetonitril gelöst. Es werden dann 365 mg Di(*N*-succinimidyl)carbonat (1.36 mmol, 1.4 Äq.) und 0.38 mL Triethylamin (2.71 mmol, 2.8 Äq.) zugegeben und sieben Stunden bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend wird das Lösungsmittel im Vakuum entfernt und der Rückstand in 60 mL 1 M  $\text{NaHCO}_3$ -Lösung aufgenommen. Die wässrige Phase wird dreimal mit 50 mL Essigester extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen werden über  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  getrocknet und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Das Rohprodukt wird durch Flash-Säulenchromatographie gereinigt ( $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$  = 99:1) und 183 mg (78 %) der Verbindung **151** als farbloses Öl erhalten. Das Verhältnis von *E*- zu *Z*-Isomer wurde aus dem  $^1\text{H}$ -NMR zu 50:50 bestimmt.

#### Durch Spaltung der Modellverbindung **147** mit 1 M TBAF in THF:

Unter inerten Bedingungen werden 0.44 g der Modellverbindung **147** (1.06 mmol, 1.0 Äq.) in 5 mL trockenem THF gelöst und zu der Lösung 4.71 g einer 1 M TBAF-Lösung in THF (5.0 Äq.) zugegeben. Es wird zehn Minuten bei Raumtemperatur gerührt, dann wird das Lösungsmittel im Vakuum entfernt und der Rückstand mittels Flash-Säulenchromatographie gereinigt (*n*Hexan/Essigester = 3:1 bis  $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$  = 90:10 + 1 %  $\text{EtMe}_2\text{N}$ ). Das Eliminierungsprodukt **151** wurde in quantitativer Ausbeute (258 mg) und in einem 1:1 Verhältnis von *E*- zu *Z*-Isomer erhalten. Auch das andere

erwartete Spaltungsprodukt 3-Phenyl-prop-2-ynylamin **152** wurde in quantitativer Ausbeute isoliert (145 mg).

**R<sub>F</sub>-Wert:** 0.35 (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH = 99:1)

**<sup>1</sup>H-NMR** (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>, 300 K): δ = 3.395 (t, 10-H<sub>2,E</sub>, 10-H<sub>2,Z</sub>), 3.63-3.72 (m, 5-H<sub>2,E</sub>, 6-H<sub>2,E</sub>, 7-H<sub>2,E</sub>, 8-H<sub>2,E</sub>, 9-H<sub>2,E</sub>, 5-H<sub>2,Z</sub>, 6-H<sub>2,Z</sub>, 7-H<sub>2,Z</sub>, 8-H<sub>2,Z</sub>, 9-H<sub>2,Z</sub>), 4.191 (dd, 4-H<sub>2,E</sub>), 4.373 (dd, 4-H<sub>2,Z</sub>), 5.461 (dt, 3-H<sub>Z</sub>), 5.735 (dt, 3-H<sub>E</sub>), 6.617 (dt, 2-H<sub>Z</sub>), 6.737 (dt, 2-H<sub>E</sub>) ppm;  $J_{2E,3E} = 16.3$  Hz,  $J_{2E,4E} = 3.7$  Hz,  $J_{3E,4E} = 2.3$  Hz,  $J_{2Z,3Z} = 11.5$  Hz,  $J_{2Z,4Z} = 6.0$  Hz,  $J_{3Z,4Z} = 1.7$  Hz

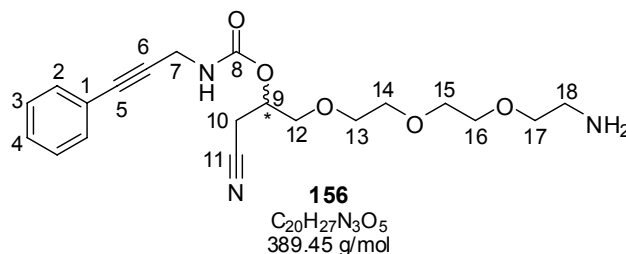
**<sup>13</sup>C-NMR** (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>, 300 K): δ = 50.73 (10-C<sub>E/Z</sub>), 69.33, 69.58, 70.09, 70.13, 70.49, 70.59, 70.64, 70.71, 70.74, 70.76, 70.78 (2C) (4-C<sub>E</sub>, 5-C<sub>E</sub>, 6-C<sub>E</sub>, 7-C<sub>E</sub>, 8-C<sub>E</sub>, 9-C<sub>E</sub>, 4-C<sub>Z</sub>, 5-C<sub>Z</sub>, 6-C<sub>E</sub>, 7-C<sub>E</sub>, 8-C<sub>E</sub>, 9-C<sub>E</sub>), 99.75 (3-C<sub>E</sub>), 100.60 (3-C<sub>Z</sub>), 115.15 (1-C<sub>Z</sub>), 117.31 (1-C<sub>E</sub>), 150.77 (2-C<sub>Z</sub>), 150.87 (2-C<sub>E</sub>) ppm

**ESI(+)-MS (*m/z*):** ber.: 240.26 [C<sub>10</sub>H<sub>16</sub>N<sub>4</sub>O<sub>3</sub>]  
gef.: 258.0 [M+NH<sub>4</sub>]<sup>+</sup>, 262.9 [M+Na]<sup>+</sup>, 240.9 [M+H]<sup>+</sup>

**EA (%):** ber.: C: 49.99 H: 6.71 N: 23.32  
gef.: C: 49.83 H: 6.76 N: 23.46



### 7.5.9 Herstellung von (3-Phenyl-prop-2-ynyl)carbaminsäure-1-{2-[2-(2-aminoethoxy)ethoxy]ethoxymethyl}-2-cyanoethylester **156**



Unter inerten Bedingungen werden 100 mg (3-Phenyl-prop-2-ynyl)carbaminsäure-1-{2-[2-(2-azidoethoxy)ethoxy]ethoxymethyl}-2-cyanoethylester **147** (0.24 mmol, 1.0 Äq.) in trockenem Pyridin gelöst, mit 154 mg Triphenylphosphan (0.48 mmol, 2.0 Äq.) versetzt und die Reaktionsmischung zwei Stunden bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend wird das Lösungsmittel im Vakuum entfernt und der Rückstand in 3 mL TFA-Lösung pH = 3 aufgenommen. Es wird 48 Stunden bei Raumtemperatur gerührt bevor das Lösungsmittel erneut im Vakuum entfernt wird. Das Rohprodukt wird mittels Flash-Säulenchromatographie (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> + 2 % EtMe<sub>2</sub>N bis CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH = 95:5 + 2 % EtMe<sub>2</sub>N) gereinigt und es werden 54 mg der reduzierten Verbindung **156** als leicht gelbes Öl erhalten.

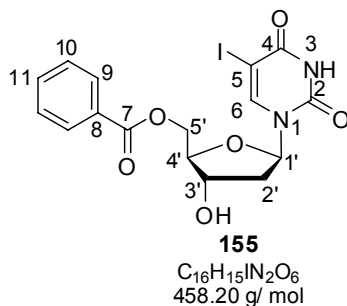
**R<sub>F</sub>-Wert:** 0.13 (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH/EtMe<sub>2</sub>N = 90:10:1)

**<sup>1</sup>H-NMR** (250 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>, 300 K): δ = 2.78-2.96 (m, 10-H<sub>2</sub>), 3.374 (t, 18-H<sub>2</sub>), 3.47-3.60 (m, 12-H<sub>2</sub>, 13-H<sub>2</sub>, 14-H<sub>2</sub>, 15-H<sub>2</sub>, 16-H<sub>2</sub>, 17-H<sub>2</sub>, 7-NH, 18-NH<sub>2</sub>), 4.045 (s, 7-H<sub>2</sub>), 4.975 („Quintett“, 9-H), 7.31-7.45 (m, 2-H<sub>2</sub>, 3-H<sub>2</sub>, 4-H) ppm

**ESI(+)-MS (*m/z*):** ber.: 389.45 [C<sub>20</sub>H<sub>27</sub>N<sub>3</sub>O<sub>5</sub>]  
gef.: 390.1 [M+H]<sup>+</sup>

## 7.6 Synthese der modifizierten Nukleoside 160 und 169

### 7.6.1 Herstellung von 5-Iodo-5'-O-benzoyl-2'-desoxyuridin 155



Der Literatur<sup>[366]</sup> folgend werden 12.00 g 5-Iodo-2'-desoxyuridin **154** (34.00 mmol, 1.00 Äq.) zunächst dreimal mit trockenem Pyridin coevaporiert und dann unter inerten Bedingungen in 200 mL trockenem Pyridin gelöst. Die Lösung wird auf -18 °C gekühlt und eine Lösung aus 5.02 g Benzoylchlorid (35.73 mmol, 1.05 Äq.) in 30 mL trockenem Dichlormethan innerhalb von 90 Minuten zugetropft. Nach der Zugabe wird weitere drei Stunden bei -18 °C gerührt, dann werden 100 mL Methanol zugegeben, um die Reaktion zu beenden. Das Lösungsmittel wird im Vakuum entfernt und der Rückstand zweimal mit Toluol coevaporiert. Das Rohprodukt wird mittels Flash-Säulenchromatographie (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> = 100 bis CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH = 90:10) gereinigt. Es werden 11.98 g (77 %, Literatur: 70 %<sup>[366]</sup>) des 5'-geschützten Nukleosids **155** als farbloser Feststoff erhalten.

**R<sub>F</sub>-Wert:** 0.13 (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH = 95:5)

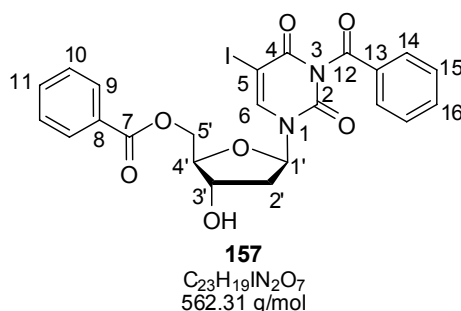
**Schmp.:** 174 °C (Literatur: 170 °C<sup>[366]</sup>)

**<sup>1</sup>H-NMR** (400 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>, 300 K): δ = 2.14-2.35 (m, 2'-H<sub>2</sub>), 4.07-4.13 (m, 4'-H), 4.33-4.38 (m, 3'-H), 4.487 (dq, 5'-H<sub>2</sub>), 5.400 (d, 3'-OH), 6.124 (t, 1'-H), 7.52-7.59 (m, 10-H<sub>2</sub>), 7.65-7.72 (m, 11-H), 7.97-8.02 (m, 6-H, 9-H<sub>2</sub>) 11.712 (s, N<sup>3</sup>H) ppm

**<sup>13</sup>C-NMR** (100 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>, 300 K): δ = 39.21 (2'-C), 64.41 (5'-C), 69.78 (5-C), 70.26 (3'-C), 84.11 (4'-C), 85.05 (1'-C), 128.89 (10-C), 129.22 (9-C), 129.26 (8-C), 133.50 (11-C), 144.43 (6-C), 149.99 (2-C), 160.40 (4-C), 165.59 (7-C) ppm

**ESI(+)-MS (*m/z*):** ber.: 458.2 [C<sub>16</sub>H<sub>15</sub>IN<sub>2</sub>O<sub>6</sub>]  
 gef.: 459.0 [M+H]<sup>+</sup>, 481.1 [M+Na]<sup>+</sup>

### 7.6.2 Herstellung von *N*<sup>3</sup>-Benzoyl-5-iodo-5'-O-benzoyl-2'-desoxyuridin **157**



In Anlehnung an die Literaturvorschrift<sup>[367]</sup> werden unter inerten Bedingungen zu einer Lösung von 1.5 g des 5'-benzoylierten 5-Iodo-2'-desoxyuridin **155** (3.27 mmol, 1.0 eq.) in 15 mL trockenem Pyridin 1.68 mL *N*-Ethyl-diisopropylamin (9.82 mmol, 3.0 Äq.) und 0.63 mL Trimethylsilylchlorid (4.91 mmol, 1.5 Äq.) zugetropft. Es wird 45 Minuten bei Raumtemperatur gerührt. Dann werden 0.84 mL Benzoylchlorid (4.91 mmol, 1.5 Äq.) zugegeben. Die Lösung färbt sich dunkelrot und es wird 15 Minuten bei Raumtemperatur gerührt. Die Reaktionslösung wird anschließend in 100 mL Eiswasser gegossen und zehn Minuten gerührt. Es wird zweimal mit 40 mL Chloroform extrahiert, die vereinigten organischen Phasen über Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> getrocknet und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Der Rückstand wird sofort weiter umgesetzt, indem er in 60 mL CHCl<sub>3</sub>/MeOH = 1:1 gelöst wird und alle 20 Minuten mit 75 µL TFA versetzt wird, bis die DC-Kontrolle die komplette Abspaltung der TMS-Gruppe anzeigt. Insgesamt werden innerhalb von zwei Stunden 375 µL TFA (4.89 mmol, 1.5 Äq.) zugegeben. Die Reaktionslösung wird mit 30 mL Chloroform verdünnt und zweimal mit 50 mL 5 %iger NaHCO<sub>3</sub>-Lösung gewaschen. Die wässrige Phase wird noch dreimal mit 30 mL Chloroform rückextrahiert und die vereinigten organischen Phasen dann über Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> getrocknet. Das Lösungsmittel wird im Vakuum entfernt und das Rohprodukt mittels einer Kieselgelfritte (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> bis CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH = 95:5) gereinigt. Es werden 1.85 g (98 %) des zweifach Benzoyl-geschützten Nukleosids **157** als gelber Schaum erhalten.

**R<sub>F</sub>-Wert:** 0.43 (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH = 95:5)

**<sup>1</sup>H-NMR** (400 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>, 300 K): δ = 2.271 (ddd, 2'-H), 2.39-2.47 (m, 2'-H'), 4.14-4.18 (m, 4'-H), 4.37-4.42 (m, 3'-H), 4.493 (dd, 5'-H), 4.558 (dd, 5'-H'), 5.487 (d, 3'-

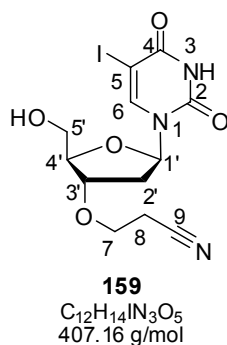
OH), 6.114 (t, 1'-H), 7.54-7.62 (m, 10-H<sub>2</sub>, 15-H<sub>2</sub>), 7.67-7.72 (m, 16-H), 7.77-7.81 (m, 11-H), 8.01-8.05 (m, 9-H<sub>2</sub>, 14-H<sub>2</sub>), 8.202 (s, 6-H) ppm;  $J_{1',2'} = 6.5$  Hz,  $J_{5',5''} = 12.1$  Hz

<sup>13</sup>C-NMR (100 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>, 300 K):  $\delta = 39.36$  (2'-C), 64.31 (5'-C), 68.54 (5-C), 70.04 (3'-C), 84.43 (4'-C), 86.06 (1'-C), 128.88, 129.26, 129.45, 130.56 (9-C, 10-C, 14-C, 15-C), 130.64 (8-C, 13-C), 133.53 (16-C), 135.65 (11-C), 145.28 (6-C), 148.66 (2-C), 159.18 (4-C), 165.61 (12-C), 168.67 (7-C) ppm

ESI(+)-MS ( $m/z$ ):  
 ber.: 562.31 [C<sub>23</sub>H<sub>19</sub>IN<sub>2</sub>O<sub>7</sub>]  
 gef.: 579.8 [M+NH<sub>4</sub>]<sup>+</sup>, 584.6 [M+Na]<sup>+</sup>, 563.2 [M+H]<sup>+</sup>, 601.1 [M+K]<sup>+</sup>

EA (%):  
 ber.: C: 49.13 H: 3.41 N: 4.98  
 gef.: C: 49.01 H: 3.67 N: 4.86

### 7.6.3 Herstellung von 5-Iodo-3'-O-(2-cyanoethyl)2'-desoxyuridin **159**



Der Literaturvorschrift<sup>[298]</sup> folgend werden in einem trockenen, 100 mL Erlenmeyerkolben mit Dreikant-Magnetrührstab und Septum unter inerten Bedingungen 1.70 g *N*<sup>3</sup>-Benzoyl-5-iodo-5'-*O*-benzoyl-2'-desoxyuridin **157** (3.02 mmol, 1.0 Äq.) in 4.5 mL Acrylnitril (68.02 mmol, 22.5 Äq.) gelöst. Die Lösung wird für zwei Minuten stark gerührt, dann werden 8 mL *t*Butanol zugegeben und für weitere fünf Minuten stark gerührt. Es werden schnell 0.99 g Cs<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (3.02 mmol, 1.0 Äq.) zugegeben und die entstandene Suspension zweieinhalb Stunden stark gerührt. Die festen Bestandteile werden anschließend durch eine Filtration über Kieselgel abgetrennt. Das Kieselgel wird mit 250 mL Methanol gewaschen und das Lösungsmittel der vereinigten organischen Phasen im Vakuum entfernt. Das Rohprodukt **158** (1.78 g) wird direkt zur Entschützung eingesetzt. Es wird in 150 mL Methanol gelöst und mit 30 mL 25 %iger, wässriger Ammoniaklösung versetzt. Es wird 20 Stunden bei Raumtemperatur gerührt, das Lösungsmittel im Vakuum entfernt und der Rückstand mittels Flash-Säulenchromatographie aufgereinigt (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> bis CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH = 98:2). Es werden

765 mg (65 %, über zwei Stufen, Literatur: 40 % über zwei Stufen<sup>[298]</sup>) des 3'-*O*-CE-modifizierten Nukleosids **159** als farbloser Schaum erhalten.

**R<sub>F</sub>-Wert:** 0.40 (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH = 90:10)

**<sup>1</sup>H-NMR** (400 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>, 300 K): δ = 2.18-2.30 (m, 2'-H<sub>2</sub>), 2.773 (t, 8-H<sub>2</sub>), 3.634 (t, 7-H<sub>2</sub>), 3.55-3.68 (m, 5'-H<sub>2</sub>), 3.94-3.98 (m, 4'-H), 4.12-4.17 (m, 3'-H), 5.19-5.25 (m, 5'-OH), 6.061 („t“, 1'-H), 8.359 (s, 6-H), 11.680 (s, N<sup>3</sup>H) ppm; *J*<sub>7,8</sub> = 6.1 Hz

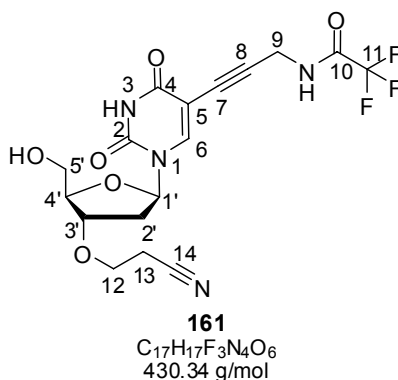
**<sup>13</sup>C-NMR** (100 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>, 300 K): δ = 18.25 (8-C), 37.05 (2'-C), 61.06 (5'-C), 63.56 (7-C), 69.51 (5-C), 78.99 (3'-C), 84.80 (1'-C), 84.82 (4'-C), 119.17 (9-C), 144.88 (6-C), 150.09 (2-C), 160.44 (4-C) ppm

**ESI(-)-MS (*m/z*):** ber.: 407.16 [C<sub>12</sub>H<sub>14</sub>IN<sub>3</sub>O<sub>5</sub>]  
gef.: 406.1 [M-1]<sup>-</sup>

**MALDI(+)-MS (*m/z*):** ber.: 407.16 [C<sub>12</sub>H<sub>14</sub>IN<sub>3</sub>O<sub>5</sub>]  
gef.: 430.00 [M+Na]<sup>+</sup>

**EA (%):** ber.: C: 35.40 H: 3.47 N: 10.32  
gef.: C: 35.51 H: 3.62 N: 10.29

#### 7.6.4 Herstellung von 5-[(2,2,2-trifluoroacetylamino)ethynyl]-3'-*O*-(2-cyanoethyl)-2'-desoxyuridin **161**



Entsprechend der Literaturvorschrift<sup>[298]</sup> werden unter inerten Arbeitsbedingungen 500 mg 5-Iodo-3'-*O*-(2-cyanoethyl)2'-desoxyuridin **159** (1.23 mmol, 1.0 Äq.) in 15 mL trockenem DMF gelöst und 0.85 mL Triethylamin (6.14 mmol, 5.0 Äq.) zugegeben. Die Lösung wird dreimal mittels Gefrier-Entgasung entgast. Nach dem Auftauen werden 48 mg Kupfer(I)iodid (0.25 mmol, 0.2 Äq.) und 143 mg Tetrakis(triphenylphosphan)-palladium (0.12 mmol, 0.1 Äq.) dazu gegeben. Das Alkin 2,2,2-Trifluor-*N*-(prop-2-ynyl)acetamid **153** (371 mg, 2.46 mmol, 2.0 Äq.) wird in zwei Portionen zugetropft, eine Hälfte wird gleich zugetropft, die andere nach einer Stunde Rühren bei

Raumtemperatur. Während des Rührens wird der Reaktionskolben mit Aluminiumfolie abgedunkelt. Es wird fünf Stunden bei Raumtemperatur im Dunkeln gerührt. Anschließend wird das Lösungsmittel im Ölpumpenvakuum entfernt, der Rückstand wird in 25 mL Dichlormethan aufgenommen und zweimal mit 25 mL 5 %iger EDTA-Lösung gewaschen. Die vereinigten wässrigen Phasen werden noch dreimal mit 30 mL Dichlormethan extrahiert, die vereinigten organischen Phasen über  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  getrocknet und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Das Rohprodukt wird über eine Kieselgelfritte gereinigt ( $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH} = 98:2$ ) und es werden 344 mg (65 %, Literatur: 91 %<sup>[298]</sup>) des Nukleosids **161** als gelbes Öl erhalten.

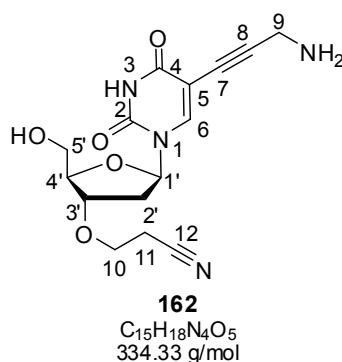
**R<sub>F</sub>-Wert:** 0.21 ( $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH} = 90:10$ )

**<sup>1</sup>H-NMR** (250 MHz, DMSO- $d_6$ , 300 K):  $\delta = 2.15\text{--}2.34$  (m, 2'-H<sub>2</sub>), 2.777 (t, 13-H<sub>2</sub>), 3.52-3.68 (m, 5'-H<sub>2</sub>), 3.632 (t, 12-H<sub>2</sub>), 3.91-3.99 (m, 4'-H), 4.11-4.17 (m, 3'-H), 4.234 (d, 9-H<sub>2</sub>), 5.177 (t, 5'-OH), 6.068 (t, 1'-H), 8.182 (s, 6-H), 10.067 (t, NH), 11.676 (t, N<sup>3</sup>H) ppm

**<sup>13</sup>C-NMR** (63 MHz, DMSO- $d_6$ , 300 K):  $\delta = 18.22$  (13-C), 29.42 (9-C), 36.93 (2'-C), 61.08 (5'-C), 63.54 (12-C), 75.29 (7-C), 79.01 (3'-C), 84.70 (1'-C), 84.90 (4'-C), 87.53 (8-C), 97.80 (5-C), 119.13 (14-C), 144.00 (6-C), 149.27 (2-C), 161.47 (4-C) ppm; die Signale der Kohlenstoffe 10 und 11 waren aufgrund ihrer geringen Intensität durch die Quartettaufspaltung nicht zu sehen

**ESI(+)-MS (*m/z*):** ber.: 430.34 [ $\text{C}_{17}\text{H}_{17}\text{F}_3\text{N}_4\text{O}_6$ ]  
gef.: 430.9 [ $\text{M}+\text{H}$ ]<sup>+</sup>

### 7.6.5 Herstellung von 5-(3-Amino-prop-2-ynyl)-3'-O-(2-cyanoethyl)-2'-desoxyuridin **162**



Entsprechend der Literatur<sup>[298]</sup> werden 300 mg 5-[(2,2,2-Trifluoro-acetyl-amino)-ethynyl]-3'-O-(2-cyanoethyl)-2'-desoxyuridin **161** (0.70 mmol, 1.0 Äq.) in 40 mL Methanol gelöst und mit 8.5 mL 25 %iger, wässriger Ammoniaklösung versetzt. Es

wird 12 Stunden bei Raumtemperatur gerührt und dann das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Das Rohprodukt **162** (230 mg, 99 %, Literatur 100 %<sup>[298]</sup>) wird ohne weitere Aufreinigung eingesetzt.

**R<sub>F</sub>-Wert:** 0.03 (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH = 90:10)

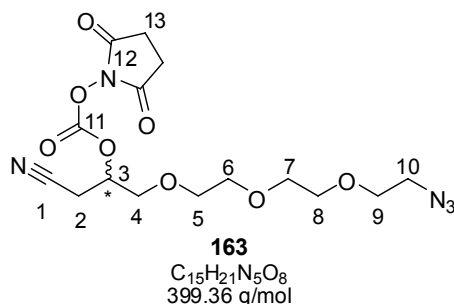
**<sup>1</sup>H-NMR** (400 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>, 300 K): δ = 2.15-2.24 (m, 2'-H), 2.278 (ddd, 2'-H'), 2.776 (t, 11-H<sub>2</sub>), 3.547 (s, 9-H<sub>2</sub>), 3.59-3.66 (m, 5'-H<sub>2</sub>, 10-H<sub>2</sub>), 3.94-3.99 (m, 4'-H), 4.13-4.18 (m, 3'-H), 5.04-6.50 (br. s, 5'-OH, N<sup>3</sup>H, NH<sub>2</sub>), 6.079 (dd, 1'-H), 8.153 (s, 6-H) ppm

**<sup>13</sup>C-NMR** (100 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>, 300 K): δ = 18.22 (11-C), 30.63 (9-C), 37.02 (2'-C), 61.13 (5'-C), 63.52 (10-C), 74.76 (7-C), 79.10 (3'-C), 84.66 (1'-C), 84.89 (4'-C), 92.88 (8-C), 98.29 (5-C), 119.15 (12-C), 143.43 (6-C), 149.39 (2-C), 161.50 (4-C) ppm

**ESI(+)-MS (*m/z*):** ber.: 334.33 [C<sub>15</sub>H<sub>18</sub>IN<sub>4</sub>O<sub>5</sub>]  
gef.: 334.9 [M+H]<sup>+</sup>, 669.4 [Dimer]<sup>+</sup>

**HR-ESI(-)-MS (*m/z*):** ber.: 333.1204 [C<sub>15</sub>H<sub>17</sub>N<sub>4</sub>O<sub>5</sub>]<sup>-</sup>  
gef.: 333.1204 [M-1]<sup>-</sup>

### 7.6.6 Herstellung von Kohlensäure-1-{2-[2-(2-azidoethoxy)-ethoxy]ethoxymethyl}-2-cyanoethylester-2,5-dioxo-pyrrolidin-1-ylester **163**



Unter inerten Bedingungen werden 0.75 g des Alkohols **143** (2.90 mmol, 1.0 Äq.) in 25 mL trockenem Acetonitril gelöst und auf 0 °C abgekühlt. Es werden dann 0.22 g wasserfreies K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (1.60 mmol, 0.55 Äq.) zugegeben und eine Stunde bei 0 °C gerührt bevor 1.96 g Di(*N*-succinimidyl)carbonat (7.26 mmol, 2.5 Äq.) hinzugefügt werden und die Suspension weitere 20 Stunden bei 0 °C gerührt wird. Das Lösungsmittel wird dann im Vakuum entfernt und der Rückstand in 50 mL Essigester und 50 mL gesättigter NaHCO<sub>3</sub>-Lösung aufgenommen. Die Phasen werden getrennt und die wässrige Phase noch mal mit 50 mL Essigester und 50 mL Dichlormethan extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen werden über Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> getrocknet und das Lösungsmittel im Vakuum

entfernt. Das Rohprodukt **163** (gelbes Öl, 1.15 g, 100 %) wird ohne weitere Aufreinigung eingesetzt.

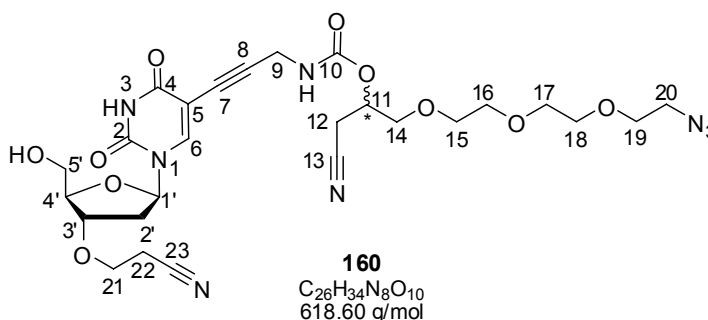
**R<sub>F</sub>-Wert:** 0.35 (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH = 99:1)

**<sup>1</sup>H-NMR** (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>, 300 K): δ = 2.853 (s, 13-H<sub>4</sub>), 2.902 (dd, 2-H), 2.968 (2-H'), 3.38-3.42 (m, 10-H<sub>2</sub>), 3.65-3.74 (m, 5-H<sub>2</sub>, 6-H<sub>2</sub>, 7-H<sub>2</sub>, 8-H<sub>2</sub>, 9-H<sub>2</sub>), 3.805 (dd, 4-H), 3.851 (dd, 4-H'), 5.100 („Quintett“, 3-H) ppm; *J*<sub>2,2'</sub> = 17.0 Hz, *J*<sub>4,4'</sub> = 11.0 Hz

**<sup>13</sup>C-NMR** (100 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>, 300 K): δ = 19.77 (2-C), 25.50 (13-C), 50.74 (10-C), 69.36, 70.09, 70.62, 70.73, 70.74, 71.35 (4-C, 5-C, 6-C, 7-C, 8-C, 9-C), 74.91 (3-C), 115.23 (1-C), 150.86 (11-C), 168.28 (12-C) ppm

**ESI(+)-MS (*m/z*):** ber.: 399.36 [C<sub>15</sub>H<sub>21</sub>N<sub>5</sub>O<sub>8</sub>]  
gef.: 417.00 [M+NH<sub>4</sub>]<sup>+</sup>, 422.00 [M+Na]<sup>+</sup>, 372.00 [M-N<sub>2</sub>+H]<sup>+</sup>

### 7.6.7 Herstellung von 5-(Prop-2-ynyl)carbaminsäure-1-{2-[2-(2-azidoethoxy)ethoxy]ethoxymethyl}-2-cyanoethyl-ester]-3'-O-(2-cyanoethyl)-2'-desoxyuridin **160**



Unter inerten Bedingungen werden 806 mg des aktivierten Carbonats **163** (2.02 mmol, 2.5 Äq.) in 4.5 mL trockenem Acetonitril gelöst, auf 0 °C gekühlt und mit 162 mg KHCO<sub>3</sub> (1.62 mmol, 2.0 Äq.) versetzt. In einem weiteren Kolben werden 270 mg 5-(3-Amino-prop-2-ynyl)-3'-O-(2-cyanoethyl)-2'-desoxyuridin **162** (0.81 mmol, 1.0 Äq.) in 4 mL trockenem Acetonitril gelöst und zu der gekühlten Lösung mit Hilfe einer Spritze zuge tropft. Es wird 30 Minuten bei 0 °C und dreieinhalb Stunden bei Raumtemperatur gerührt. Das Lösungsmittel wird dann im Vakuum entfernt und der Rückstand in 25 mL gesättigter NH<sub>4</sub>Cl-Lösung und 25 mL Dichlormethan aufgenommen. Die organische Phase wird mit 20 mL gesättigter NaCl-Lösung gewaschen und die vereinigten wässrigen Phasen noch zweimal mit 30 mL Dichlormethan extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen werden über Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> getrocknet und das Lösungsmittel im Vakuum



entfernt. Das Rohprodukt wird durch eine Flash-Säulenchromatographie gereinigt ( $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH} = 98:2$  bis  $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH} = 95:5$ ) und es werden 328 mg (66 %) des Linker-modifizierten Nukleosids **160** als gelbes Öl erhalten.

**R<sub>F</sub>-Wert:** 0.39 ( $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH} = 90:10$ )

**<sup>1</sup>H-NMR** (400 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>, 300 K):  $\delta = 2.17\text{--}2.31$  (m, 2'-H<sub>2</sub>), 2.773 (t, 22-H<sub>2</sub>), 2.839 (dd, 12-H), 2.878 (dd, 12-H'), 3.387 (t, 20-H<sub>2</sub>), 3.51-3.65 (m, 5'-H<sub>2</sub>, 22-H<sub>2</sub>, 14-H<sub>2</sub>, 15-H<sub>2</sub>, 16-H<sub>2</sub>, 17-H<sub>2</sub>, 18-H<sub>2</sub>, 19-H<sub>2</sub>), 3.93-3.97 (m, 4'-H), 4.022 (d, 9-H<sub>2</sub>), 4.12-4.16 (m, 3'-H), 4.954 („Quintett“, 11-H), 5.169 (t, 5'-OH), 6.071 („t“, 1'-H), 7.934 (t, NH), 8.139 (s, 6-H), 11.642 (s, N<sup>3</sup>H) ppm;  $J_{12,12'} = 17.3$  Hz,  $J_{9,NH} = 5.5$  Hz

**<sup>13</sup>C-NMR** (100 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>, 300 K):  $\delta = 18.25$  (22-C), 19.73 (12-C), 30.69 (9-C), 36.90 (2'-C), 50.00 (20-C), 61.14 (5'-C), 63.55 (21-C), 67.91 (11-C), 69.25, 69.66, 69.68, 69.82, 70.21 (15-C, 16-C, 17-C, 18-C, 19-C), 70.30 (14-C), 74.49 (7-C), 79.09 (3'-C), 84.62 (1'-C), 84.88 (4'-C), 89.61 (8-C), 98.23 (5-C), 117.71 (13-C), 119.17 (23-C), 143.60 (6-C), 149.42 (2-C), 154.88 (10-C), 161.53 (4-C) ppm

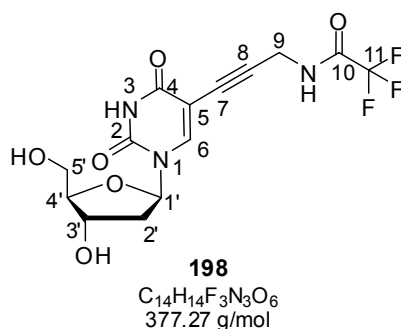
**FT-IR (NaCl):**  $\nu = 3650\text{--}3120$  (m br., -O-H, -N-H), 3056 (m br., C-H arom.), 2874 (m br., -CH<sub>2</sub>), 2252 (m, -C≡N, -C≡C-), 2103 (s, -N<sub>3</sub>), 1780-1630 (m br., -C=O) cm<sup>-1</sup>

**MALDI(+)-MS (*m/z*):** ber.: 618.60 [C<sub>26</sub>H<sub>34</sub>N<sub>8</sub>O<sub>10</sub>]  
gef.: 592.73 [M-N<sub>2</sub>+2H]<sup>+</sup>, 641.01 [M+Na]<sup>+</sup>, 656.93 [M+K]<sup>+</sup>

**ESI(+)-MS (*m/z*):** ber.: 618.60 [C<sub>26</sub>H<sub>34</sub>N<sub>8</sub>O<sub>10</sub>]  
gef.: 636.4 [M+NH<sub>4</sub>]<sup>+</sup>, 641.5 [M+Na]<sup>+</sup>, 619.5 [M]<sup>+</sup>

**EA (%):** ber.: C: 50.48 H: 5.54 N: 18.11  
gef.: C: 50.27 H: 5.33 N: 17.93

### 7.6.8 Herstellung von 5-[(2,2,2-Trifluoroacetylamino)ethynyl]-2'-desoxyuridin **198**



Der Literaturvorschrift<sup>[357]</sup> folgend werden unter inerten Bedingungen 500 mg 5-Iodo-2'-desoxyuridin **154** (1.41 mmol, 1.0 Äq.) in 15 mL trockenem DMF gelöst und 0.79 mL Triethylamin (5.65 mmol, 4.0 Äq.) zugegeben. Die Lösung wird dreimal mittels Gefrier-Entgasung entgast. Nach dem Auftauen werden 55 mg Kupfer(I)iodid (0.28 mmol, 0.2 Äq.) und 165 mg Tetrakis(triphenylphosphan)palladium (0.14 mmol, 0.1 Äq.) dazu gegeben. Das Alkin 2,2,2-Trifluor-*N*-(prop-2-ynyl)acetamid **153** (371 mg, 2.46 mmol, 2.0 Äq.) wird in zwei Portionen zugetropft, eine Hälfte wird gleich zugetropft, die andere nach einer Stunde Rühren bei Raumtemperatur. Während des Rührens wird der Reaktionskolben mit Aluminiumfolie abgedunkelt. Es wird dreieinhalb Stunden bei Raumtemperatur im Dunkeln gerührt. Anschließend wird das Lösungsmittel im Ölpumpenvakuum entfernt, der Rückstand wird in 50 mL Dichlormethan aufgenommen und zweimal mit 50 mL 5 %iger EDTA-Lösung gewaschen. Nach dem Waschen befindet sich das Nukleosid in der wässrigen Phase. Diese wird daher viermal mit 50 mL Ethylmethyleketon extrahiert. Die vereinigten Ethylmethyleketon Phasen werden über  $Na_2SO_4$  getrocknet und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Das Produkt **198** (540 mg, 100 %, Literatur: 77 %<sup>[357]</sup>) ist ein orangebraunes Öl und konnte ohne weitere Aufreinigung verwendet werden.

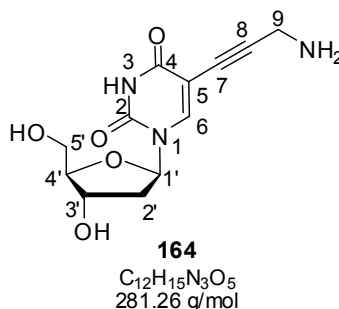
**R<sub>F</sub>-Wert:** 0.18 ( $CH_2Cl_2/MeOH = 90:10$ )

**<sup>1</sup>H-NMR** (250 MHz, DMSO- $d_6$ , 300 K):  $\delta$  = 2.09-2.15 (m, 2'-H<sub>2</sub>), 3.50-3.65 (m, 5'-H<sub>2</sub>), 3.792 (q, 3'-H), 4.17-4.27 (m, 4'-H, 9-H<sub>2</sub>), 5.086 (t, 5'-OH), 5.238 (d, 3'-OH), 6.101 (t, 1'-H), 8.193 (s, 6-H), 10.066 (t, NH), 11.646 (s, N<sup>3</sup>H) ppm

**<sup>13</sup>C-NMR** (100 MHz, DMSO- $d_6$ , 300 K):  $\delta$  = 29.44 (9-C), 40.08 (2'-C), 60.98 (5'-C), 70.18 (3'-C), 75.37 (7-C), 84.79 (1'-C), 87.46 (8-C), 87.64 (4'-C), 97.65 (5-C), 144.12

(6-C), 149 (11-C), 161.54 (4-C) ppm; die Signale der Kohlenstoffe 10 und 11 waren aufgrund ihrer geringen Intensität durch die Quartettaufspaltung nicht zu sehen

### 7.6.9 Herstellung von 5-(3-Amino-prop-2-ynyl)-2'-desoxyuridin **164**



500 mg 5-[(2,2,2-Trifluoro-acetyl-amino)ethynyl]-2'-desoxyuridin **198** (1.33 mmol, 1.0 Äq.) werden in 35 mL Methanol gelöst und mit 12.0 mL konzentrierter, wässriger Ammoniaklösung versetzt. Es wird 16 Stunden bei Raumtemperatur gerührt und das Lösungsmittel anschließend im Vakuum entfernt. Das quantitativ erhaltene Rohprodukt (372 mg, braunes Öl) wird ohne weitere Aufreinigung verwendet.

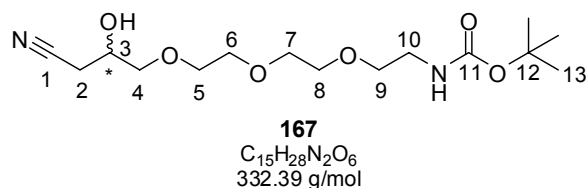
**R<sub>F</sub>-Wert:** 0.03 (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH = 90:10)

**<sup>1</sup>H-NMR** (400 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>, 300 K): δ = 2.06-2.18 (m, 2'-H<sub>2</sub>), 3.54-3.64 (m, 5'-H<sub>2</sub>), 3.818 (q, 3'-H), 3.935 (s, 9-H<sub>2</sub>), 4.21-4.26 (m, 4'-H), 4.82-5.61 (br. m, 3'-OH, 5'-OH), 6.100 (t, 1'-H), 8.247 (s, 6-H), 8.28-9.48 (br. s, N<sup>3</sup>H, NH<sub>2</sub>) ppm

**<sup>13</sup>C-NMR** (100 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>, 300 K): δ = 29.27 (9-C), 40.32 (2'-C), 61.02 (5'-C), 70.25 (3'-C), 78.68 (7-C), 85.03 (1'-C), 85.50 (8-C), 87.80 (4'-C), 97.12 (5-C), 144.64 (6-C), 149.39 (2-C), 161.49 (4-C) ppm

**ESI(+)-MS (*m/z*):** ber.: 281.26 [C<sub>12</sub>H<sub>15</sub>N<sub>3</sub>O<sub>5</sub>]  
 gef.: 281.9 [M+H]<sup>+</sup>, 563.2 [2M+H]<sup>+</sup>

### 7.6.10 Herstellung von (2-{2-[2-(3-Cyano-2-hydroxypropoxy)-ethoxy]ethoxy}ethyl)carbaminsäure-*tert*-butylester **167**



Unter inerten Bedingungen werden 5 g des Azidoalkohols **143** (19.36 mmol, 1.0 Äq.) in 40 mL trockenem Dioxan gelöst, mit 10.47 g Triphenylphosphin (38.72 mmol, 2.0 Äq.) versetzt und acht Stunden bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend werden 100 mL 25%ige, wässrige Ammoniak-Lösung zugegeben und weitere zwölf Stunden bei Raumtemperatur gerührt. Das Lösungsmittel wird im Vakuum entfernt und der Rückstand in 100 mL Dichlormethan gelöst und dreimal mit 25 mL 1 M HCl extrahiert. Die wässrige Phase wird mit festem  $NaHCO_3$  neutralisiert, 40 mL Dioxan und weitere 2.4 g  $NaHCO_3$  (29.00 mmol, 1.5 Äq.) zugegeben. Innerhalb von 20 Minuten werden unter Eiskühlung 8.7 g  $Boc_2O$  (38.72 mmol, 2.00 Äq.) portionsweise zugegeben. Die Reaktionsmischung wird auf Raumtemperatur erwärmt und zehn Stunden gerührt. Nachdem das Lösungsmittel im Vakuum entfernt wurde wird der Rückstand in 100 mL demineralisiertem Wasser and 100 mL Ethylacetat aufgenommen. Die wässrige Phase wird noch zweimal mit 70 mL Ethylacetat extrahiert, die vereinigten organischen Phasen über  $Na_2SO_4$  getrocknet und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Der ölige Rückstand wird mittels Flash-Säulenchromatographie ( $CH_2Cl_2/MeOH = 99:1 + 1\% EtMe_2N$ ) aufgereinigt und das Produkt **167** in quantitativer Ausbeute (6.45 g, 100 %) als leicht gelbliches Öl erhalten.

**R<sub>F</sub>-Wert:** 0.51 ( $CH_2Cl_2/MeOH/NH_3 = 90:10:1$ )

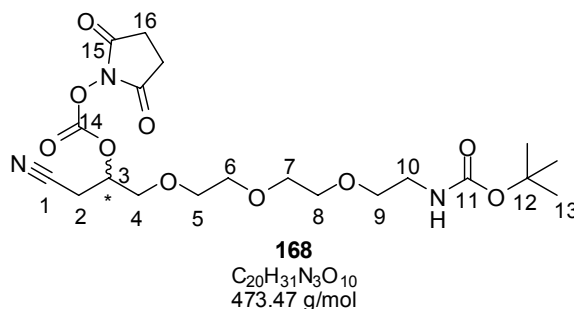
**<sup>1</sup>H-NMR** (300 MHz, DMSO- $d_6$ , 300 K):  $\delta = 1.368$  (s, 13-H<sub>9</sub>), 2.518 (dd, 2-H), 2.645 (dd, 2-H'), 3.058 (q, 10-H<sub>2</sub>), 3.27-3.45 (m, 4-H<sub>2</sub>, 9-H<sub>2</sub>), 3.48-3.56 (m, 5-H<sub>2</sub>, 6-H<sub>2</sub>, 7-H<sub>2</sub>, 8-H<sub>2</sub>), 3.864 (m, 3-H), 5.443 (d, OH), 6.703 (m, NH) ppm;  $J_{2,2'} = 16.8$  Hz

**<sup>13</sup>C-NMR** (75 MHz, DMSO- $d_6$ , 300 K):  $\delta = 22.47$  (2-C), 28.19 (13-C), 39.69 (10-C), 65.25 (3-C), 69.18 (9-C), 69.50, 69.67, 69.75, 70.14 (5-C, 6-C, 7-C, 8-C), 73.37 (4-C), 77.56 (12-C), 118.71 (1-C), 155.54 (11-C) ppm

**ESI(+)-MS (*m/z*):** ber.: 332.39 [ $C_{15}H_{28}N_2O_6$ ]  
 gef.: 355.2 [ $M+Na$ ]<sup>+</sup>, 333.1 [ $M+H$ ]<sup>+</sup>, 350.2 [ $M+NH_4$ ]<sup>+</sup>

EA (%):	ber.:	C: 54.20	H: 8.49	N: 8.43
	gef.:	C: 54.19	H: 8.57	N: 8.25

### 7.6.11 Herstellung von Kohlensäure-1-{2-[2-(2-*tert*-butoxy-carbonylaminoethoxy)ethoxy]ethoxymethyl}-2-cyano-ethylester-2,5-dioxo-pyrrolidin-1-ylester **168**



Unter inerten Bedingungen werden 5.27 g des Alkohols **167** (15.86 mmol, 1.0 Äq.) in 150 mL trockenem Acetonitril gelöst und auf 0 °C gekühlt. Es werden dann 1.11 g wasserfreies K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (7.93 mmol, 0.5 Äq.) zugegeben und zwei Stunden bei 0 °C gerührt. Anschließend werden 10.69 g Di(*N*-succinimidyl)carbonat (39. mmol, 2.5 Äq.) zugegeben und weitere 24 Stunden bei 0 °C gerührt. Das Lösungsmittel wird im Vakuum entfernt und der Rückstand in 75 mL demineralisiertem Wasser und 75 mL Ethylacetat aufgenommen. Die wässrige Phase wird noch zweimal mit 50 mL Dichlormethan extrahiert, die vereinigten organischen Phasen über Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> getrocknet und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Zu dem festen Rückstand werden zunächst 30 mL Dichlormethan zugegeben und die unlöslichen Bestandteile abfiltriert. Zu der Lösung werden dann 60 mL Diethylether hinzugefügt und die Suspension zwei Stunden bei 4 °C stehen gelassen und erneut abfiltriert. Das Lösungsmittel wird im Vakuum entfernt und das Rohprodukt **168** (6.73 g, 90 %, gelbes Öl) wird ohne weitere Aufreinigung verwendet.

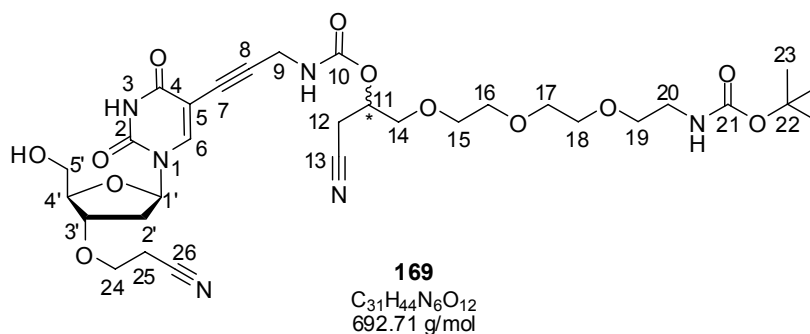
**R<sub>F</sub>-Wert:** 0.03 (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH/NH<sub>3</sub> = 90:10:1)

**<sup>1</sup>H-NMR** (400 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>, 300 K): δ = 1.372 (s, 13-H<sub>9</sub>), 2.817 (s, 16-H<sub>4</sub>), 3.01-3.11 (m, 2-H<sub>2</sub>, 10-H<sub>2</sub>), 3.374 (t, 9-H<sub>2</sub>), 3.47-3.61 (m, 5-H<sub>2</sub>, 6-H<sub>2</sub>, 7-H<sub>2</sub>, 8-H<sub>2</sub>), 3.654 (dd, 4-H), 3.701 (dd, 4-H'), 5.16-5.23 (m, 3-H), 6.68-6.77 (m, *NH*) ppm; *J*<sub>4,4'</sub> = 11.6 Hz

**<sup>13</sup>C-NMR** (100 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>, 300 K): δ = 19.12 (2-C), 25.34 (16-C), 28.19 (13-C), 39.65 (10-C), 69.21 (9-C), 69.45, 69.57, 69.68, 69.74, 70.27 (4-C, 5-C, 6-C, 7-C, 8-C), 75.57 (3-C), 77.55 (12-C), 116.79 (1-C), 150.63 (14-C), 155.54 (11-C), 169.61 (15-C) ppm

ESI(+)-MS ( $m/z$ ): ber.: 473.47 [ $C_{20}H_{31}N_3O_{10}$ ]  
 gef.: 491.0 [ $M+NH_4$ ]<sup>+</sup>, 496.2 [ $M+Na$ ]<sup>+</sup>, 474.1 [ $M$ ]<sup>+</sup>

### 7.6.12 Herstellung von 5-(Prop-2-ynyl)carbaminsäure-1-{2-[2-(2-*tert*-butoxycarbonylaminoethoxy)ethoxy]ethoxymethyl}-2-cyanoethylester]-3'-O-(2-cyanoethyl)-2'-desoxyuridin **169**



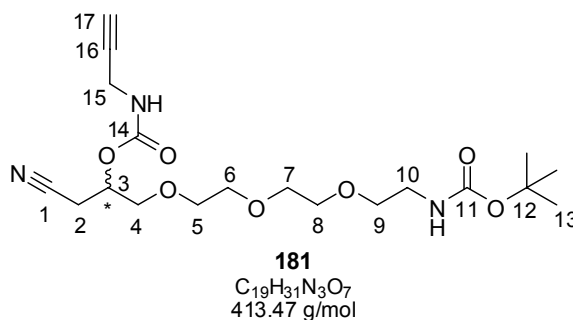
#### Variante A: aus dem 5-Propargylamino-modifizierten Nukleosid **162** und dem aktivierten Linker **168**

Unter inerten Bedingungen werden 2.24 g des aktivierten Linkers **168** (4.74 mmol, 2.2 Äq.) in 15 mL trockenem Acetonitril gelöst und auf 0 °C gekühlt und 0.43 g  $KHCO_3$  (4.31 mmol, 2.0 Äq.) zugegeben. In einem separaten Kolben wird 1.0 g des Nukleosids **162** (2.15 mmol, 1.0 Äq.) in 10 mL trockenem Acetonitril gelöst und mit Hilfe einer Spritze tropfenweise zu der gekühlten Lösung des aktivierten Linkers **168** gegeben. Die Reaktionsmischung wird eine Stunde bei 0 °C und dreieinhalb Stunden bei Raumtemperatur gerührt. Das Lösungsmittel wird dann im Vakuum entfernt und der Rückstand in 75 mL demineralisiertem Wasser und 100 mL Dichlormethan aufgenommen. Die wässrige Phase wird noch zweimal mit 75 mL Dichlormethan extrahiert, die vereinigten organischen Phasen über  $Na_2SO_4$  getrocknet und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Das Rohprodukt wird mittels Flash-Säulenchromatographie ( $CH_2Cl_2/MeOH = 99:1$  bis  $CH_2Cl_2/MeOH = 90:10$ ) gereinigt und es werden 1.15 g (77 %) des modifizierten Nukleosids **169** als farbloser Schaum erhalten.

**Variante B** und analytische Daten siehe Kapitel 7.7.3.

## 7.7 Anbindung des Boc-geschützten Linkers 181 durch Sonogashira Kupplung

### 7.7.1 Herstellung von Prop-2-ynyl-carbaminsäure-1-{2-[2-(2-*tert*-butoxycarbonylaminoethoxy)ethoxy]ethoxy-methyl}-2-cyanoethylester 181



Unter inerten Bedingungen wird eine Lösung aus 0.87 g des Aminoalkohols **167** (2.61 mmol, 1.0 Äq.) in 50 mL trockenem Acetonitril auf 0 °C gekühlt und mit 0.36 g wasserfreiem K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (2.61 mmol, 1.0 Äq.) versetzt. Es wird zwei Stunden bei 0 °C gerührt und dann 1.41 g Di(*N*-succinimidyl)carbonat (5.22 mmol, 2.0 Äq.) zugegeben und weitere 20 Stunden bei 0 °C gerührt. Anschließend werden 0.65 g KHCO<sub>3</sub> (6.52 mmol, 2.5 Äq.) und 0.54 mL Propargylamin **150** (8.35 mmol, 3.2 Äq.) nacheinander zugegeben und die Reaktionsmischung erst eine Stunde bei 0 °C und dann vier Stunden bei Raumtemperatur gerührt. Nachdem das Lösungsmittel im Vakuum entfernt wurde wird der Rückstand in 50 mL gesättigter NaHCO<sub>3</sub>-Lösung und 50 mL Dichlormethan aufgenommen, die organische Phase wird nochmals mit 50 mL gesättigter NH<sub>4</sub>Cl-Lösung gewaschen und die vereinigten wässrigen Phasen anschließend zweimal mit 50 mL Dichlormethan rückextrahiert. Die vereinigten organischen Phasen werden über Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> getrocknet und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Der ölige Rückstand wird mittels Flash-Säulenchromatographie (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH = 99:1 bis CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH = 98:2) gereinigt und 728 mg (68 %) des Produkts **181** als farbloses Öl erhalten.

**R<sub>F</sub>-Wert:** 0.25 (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH = 95:5)

**<sup>1</sup>H-NMR** (250 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>, 300 K): δ = 1.371 (s, 13-H<sub>9</sub>), 2.77-2.95 (m, 2-H<sub>2</sub>), 3.056 (q, 10-H<sub>2</sub>), 3.102 (t, 17-H), 3.371 (t, 9-H<sub>2</sub>), 3.47-3.62 (m, 4-H<sub>2</sub>, 5-H<sub>2</sub>, 6-H<sub>2</sub>, 7-H<sub>2</sub>),

8-H<sub>2</sub>), 3.782 (dd, 15-H<sub>2</sub>), 4.948 („Quintett“, 3-H), 6.740 (t, N<sup>Boc</sup>H), 7.867 (t, NH) ppm;  $J_{9,10} = 5.9$  Hz,  $J_{15,NH} = 5.8$  Hz,  $J_{15,17} = 2.5$  Hz

<sup>13</sup>C-NMR (63 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>, 300 K):  $\delta = 19.71$  (2-C), 28.22 (13-C), 29.82 (15-C), 39.68 (10-C), 67.86 (3-C), 69.17 (9-C), 69.50, 69.61, 69.74, 70.20, 70.31 (4-C, 5-C, 6-C, 7-C, 8-C), 73.14 (17-C), 77.60 (12-C), 81.06 (16-C), 117.67 (1-C), 154.87 (14-C), 155.57 (11-C) ppm

ESI(+)-MS ( $m/z$ ): ber.: 413.47 [C<sub>19</sub>H<sub>31</sub>N<sub>3</sub>O<sub>7</sub>]  
gef.: 436.1 [M+Na]<sup>+</sup>, 414.2 [M+H]<sup>+</sup>, 314.0 [M-Boc+H]<sup>+</sup>

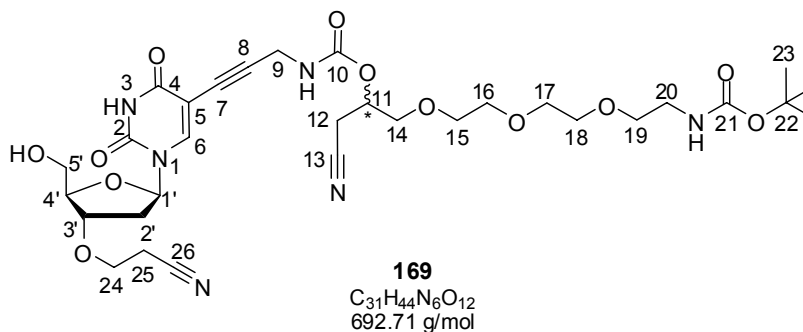
EA (%): ber.: C: 55.19 H: 7.56 N: 10.16  
gef.: C: 55.09 H: 7.59 N: 10.04

### 7.7.2 AVV 1 – Sonogashira Kupplung des kompletten Linkers 181 an die 3'-modifizierten Nukleoside

Unter inerten Bedingungen wird das jeweilige Nukleosid **159**, **182**, **183** und **184** in trockenem DMF (10 mL/mmol) und Triethylamin (5.0 Äq.) gelöst. Die Lösung wird durch dreimalige Gefrier-Entgasung entgast. Nach dem Auftauen werden nacheinander Kupfer(I)iodid (0.2 Äq.) und Tetrakis(triphenylphosphan)palladium (0.1 Äq.) zugegeben. In einem zweiten Schlenkkolben werden 1.2 Äq. bis 2.0 Äq. des Alkins **181** in trockenem DMF (2.5 mL/mmol) gelöst und mit Hilfe einer Spritze in zwei Portionen zugegeben. Die erste Hälfte wird direkt zugetropft, die andere Hälfte nach einer Stunde Rühren bei Raumtemperatur. Insgesamt wird dreieinhalb bis fünf Stunden bei Raumtemperatur gerührt, der Reaktionskolben wird dabei mit Aluminiumfolie abgedunkelt. Anschließend wird das Lösungsmittel im Ölpumpenvakuum entfernt. Der Rückstand wird in Dichlormethan (100 mL/mmol) und 5 %iger EDTA-Lösung (50 mL/mmol) aufgenommen und zehn Minuten stark gerührt. Die organische Phase wird noch mal mit 5 %iger EDTA-Lösung (50 mL/mmol) gewaschen und die vereinigten organischen Phasen dann über Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> getrocknet. Nach Entfernung des Lösungsmittels im Vakuum wird das Rohprodukt mittels Flash-Säulenchromatographie gereinigt. Dabei werden Lösungsmittelgemische aus Dichlormethan und Methanol verwendet.



### 7.7.3 Herstellung von 5-(Prop-2-ynyl)carbaminsäure-1-{2-[2-(2-*tert*-butoxycarbonylaminoethoxy)ethoxy]ethoxymethyl}-2-cyanoethylester-3'-*O*-(2-cyanoethyl)-2'-desoxyuridin **169**



Der AVV 1 folgend werden 250 mg 5-Iodo-3'-*O*-(2-cyanoethyl)-2'-desoxyuridin **159** (0.61 mmol, 1.0 Äq.) mit 305 mg des Alkins **181** (0.74 mmol, 1.2 Äq.) umgesetzt und mittels Flash-Säulenchromatographie aufgereinigt (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH = 99:1 bis CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH = 90:10). Es werden 340 mg (80 %) der Verbindung **169** als gelbliches Öl erhalten.

**R<sub>F</sub>-Wert:** 0.34 (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH = 90:10)

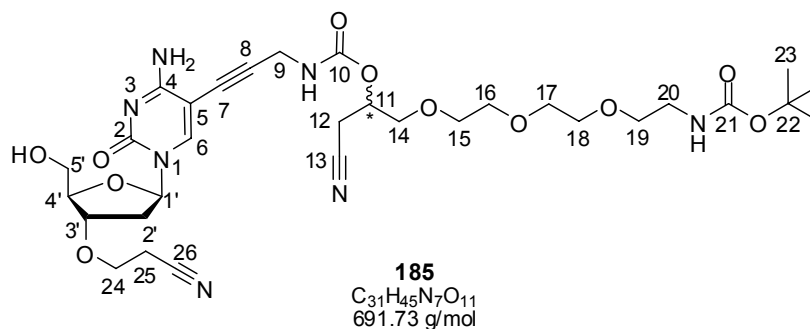
**<sup>1</sup>H-NMR** (300 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>, 300 K): δ = 1.370 (s, 23-H<sub>9</sub>), 2.16-2.31 (m, 2'-H<sub>2</sub>), 2.774 (t, 25-H<sub>2</sub>), 2.876 (m, 12-H<sub>2</sub>), 3.055 (q, 20-H<sub>2</sub>), 3.370 (t, 19-H<sub>2</sub>), 3.48-3.65 (m, 5'-H<sub>2</sub>, 24-H<sub>2</sub>, 14-H<sub>2</sub>, 15-H<sub>2</sub>, 16-H<sub>2</sub>, 17-H<sub>2</sub>, 18-H<sub>2</sub>), 3.93-3.97 (m, 4'-H), 4.022 (d, 9-H<sub>2</sub>), 4.138 (Quintett, 3'-H), 4.953 (Quintett, 11-H), 5.13-5.19 (m, 5'-OH), 6.071 (t, 1'-H), 6.68-6.77 (m, N<sup>Boc</sup>H), 7.933 (t, NH), 8.137 (s, 6-H), 11.643 (s, N<sup>3</sup>H) ppm; *J*<sub>9,NH</sub> = 5.7 Hz, *J*<sub>19,20</sub> = 6.0 Hz

**<sup>13</sup>C-NMR** (75 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>, 300 K): δ = 18.23 (25-C), 19.72 (12-C), 28.21 (23-C), 30.68 (9-C), 36.90 (2'-C), 39.69 (20-C), 61.14 (5'-C), 63.56 (24-C), 67.91 (11-C), 69.17 (19-C), 69.49, 69.60, 69.73, 70.21, 70.30 (14-C, 15-C, 16-C, 17-C, 18-C), 74.49 (7-C), 77.58 (22-C), 79.08 (3'-C), 84.64 (1'-C), 84.89 (4'-C), 89.57 (8-C), 98.23 (5-C), 117.64 (13-C), 119.26 (26-C), 143.40 (2-C), 143.56 (6-C), 154.84 (10-C), 155.54 (21-C), 161.49 (4-C) ppm

**ESI(+)-MS (*m/z*):** ber.: 692.71 [C<sub>31</sub>H<sub>44</sub>N<sub>6</sub>O<sub>12</sub>]  
gef.: 710.5 [M+NH<sub>4</sub>]<sup>+</sup>, 715.4 [M+Na]<sup>+</sup>

**EA (%):** ber.: C: 53.75 H: 6.40 N: 12.12  
gef.: C: 53.53 H: 6.51 N: 11.88

#### 7.7.4 Herstellung von 5-(Prop-2-ynyl)carbaminsäure-1-{2-[2-(2-*tert*-butoxycarbonylaminoethoxy)ethoxy]ethoxymethyl}-2-cyanoethylester-3'-O-(2-cyanoethyl)-2'-desoxycytidin **185**



Der AVV 1 folgend werden 77 mg 5-Iodo-3'-O-(2-cyanoethyl)-2'-desoxycytidin **182** (0.19 mmol, 1.0 Äq.) mit 157 mg des Alkins **181** (0.38 mmol, 2.0 Äq.) umgesetzt und mittels Flash-Säulenchromatographie aufgereinigt (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH = 98:2 bis CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH = 92:8). Es werden 102 mg (78 %) der Verbindung **185** als leicht gelber Schaum erhalten.

**R<sub>F</sub>-Wert:** 0.11 (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH = 90:10)

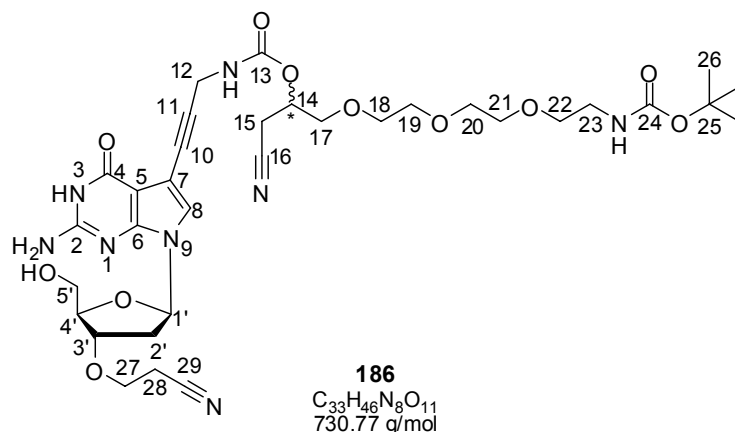
**<sup>1</sup>H-NMR** (400 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>, 300 K): δ = 1.368 (s, 23-H<sub>9</sub>), 2.03-2.12 (m, 2'-H), 2.25-2.32 (m, 2'-H'), 2.771 (t, 25-H<sub>2</sub>), 2.846 (dd, 12-H), 2.912 (dd, 12-H'), 3.055 (q, 20-H<sub>2</sub>), 3.366 (t, 19-H<sub>2</sub>), 3.47-3.65 (m, 5'-H<sub>2</sub>, 24-H<sub>2</sub>, 14-H<sub>2</sub>, 15-H<sub>2</sub>, 16-H<sub>2</sub>, 17-H<sub>2</sub>, 18-H<sub>2</sub>), 3.93-3.97 (m, 4'-H), 4.060 (d, 9-H<sub>2</sub>), 4.10-4.15 (m, 3'-H), 4.93-4.99 (m, 11-H), 5.11-5.16 (m, 5'-OH), 6.083 (t, 1'-H), 6.70-6.76 (m, N<sup>Boc</sup>H), 6.826 (s, 4-NH), 7.803 (s, 4-NH'), 7.88-7.94 (m, N<sup>Carbamat</sup>H), 8.094 (s, 6-H) ppm; *J*<sub>12,12'</sub> = 17.3 Hz, *J*<sub>19,20</sub> = 5.9 Hz

**<sup>13</sup>C-NMR** (100 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>, 300 K): δ = 18.22 (25-C), 19.73 (12-C), 28.22 (23-C), 31.08 (9-C), 37.58 (2'-C), 39.67 (20-C), 61.20 (5'-C), 63.53 (24-C), 67.93 (11-C), 69.16 (19-C), 69.48, 69.60, 69.73, 70.20, 70.30 (14-C, 15-C, 16-C, 17-C, 18-C), 74.59 (7-C), 77.58 (22-C), 79.17 (3'-C), 84.77 (4'-C), 85.31 (1'-C), 89.46 (5-C), 91.64 (8-C), 117.68 (13-C), 119.15 (26-C), 143.89 (6-C), 153.35 (2-C), 154.82 (10-C), 155.56 (21-C), 164.30 (4-C) ppm

**ESI(+)-MS (*m/z*):**  
ber.: 691.73 [C<sub>31</sub>H<sub>45</sub>N<sub>7</sub>O<sub>11</sub>]  
gef.: 692.3 [M+H]<sup>+</sup>, 714.4 [M+Na]<sup>+</sup>

**EA (%):**  
ber.: C: 53.83 H: 6.56 N: 14.17  
gef.: C: 53.57 H: 6.62 N: 13.98

### 7.7.5 Herstellung von 7-Deaza-7-(prop-2-ynyl)carbaminsäure-1-{2-[2-(2-*tert*-butoxycarbonylaminoethoxy)ethoxy]ethoxymethyl}-2-cyanoethylester-3'-*O*-(2-cyanoethyl)-2'-desoxyguanosin **186**



Der AVV 1 folgend werden 187 mg 7-Deaza-7-iodo-3'-*O*-(2-cyanoethyl)-2'-desoxyguanosin **183** (0.42 mmol, 1.0 Äq.) mit 260 mg des Alkins **181** (0.63 mmol, 1.5 Äq.) umgesetzt und mittels Flash-Säulenchromatographie aufgereinigt (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> = 100 bis CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH = 90:10). Es werden 230 mg (75 %) der Verbindung **186** als leicht gelber Schaum erhalten.

**R<sub>F</sub>-Wert:** 0.36 (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH = 90:10)

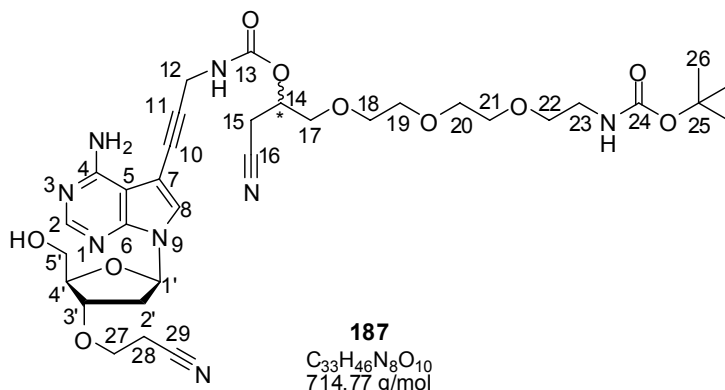
**<sup>1</sup>H-NMR** (300 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>, 300 K): δ = 1.372 (s, 26-H<sub>9</sub>), 2.265 (ddd, 2'-H), 2.36-2.47 (m, 2'-H'), 2.793 (t, 28-H<sub>2</sub>), 2.82-2.97 (m, 15-H<sub>2</sub>), 3.058 (q, 23-H<sub>2</sub>), 3.36 (t, 22-H<sub>2</sub>), 3.46-3.62 (m, 5'-H<sub>2</sub>, 17-H<sub>2</sub>, 18-H<sub>2</sub>, 19-H<sub>2</sub>, 20-H<sub>2</sub>, 21-H<sub>2</sub>), 3.652 (t, 27-H<sub>2</sub>), 3.87-3.94 (m, 4'-H), 4.027 (d, 12-H<sub>2</sub>), 4.14-4.20 (m, 3'-H), 4.91-5.05 (m, 14-H, 5'-OH), 6.228 (dd, 1'-H), 6.351 (br. s, 2-NH<sub>2</sub>), 6.734 (t, 23-NH), 7.271 (s, 8-H), 7.917 (t, 12-NH), 10.504 (s, N<sup>1</sup>H) ppm; *J*<sub>12,NH</sub> = 5.5 Hz, *J*<sub>27,28</sub> = 6.1 Hz

**<sup>13</sup>C-NMR** (75 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>, 300 K): δ = 18.23 (28-C), 19.70 (15-C), 28.18 (26-C), 30.62 (12-C), 36.50 (2'-C), 39.65 (23-C), 61.79 (5'-C), 63.40 (27-C), 67.78 (14-C), 69.13 (22-C), 69.45, 69.56, 69.69, 70.18, 70.28 (17-C, 18-C, 19-C, 20-C, 21-C), 76.24 (10-C), 77.55 (25-C), 79.99 (3'-C), 82.23 (1'-C), 84.37 (4'-C), 86.37 (11-C), 98.46 (7-C), 99.34 (5-C), 117.64 (16-C), 119.20 (29-C), 122.02 (8-C), 150.34 (4-C), 153.18, 157.72 (2-C, 6-C), 154.83 (13-C), 155.52 (24-C) ppm

**ESI(+)-MS (*m/z*):** ber.: 730.77 [C<sub>33</sub>H<sub>46</sub>N<sub>8</sub>O<sub>11</sub>]  
gef.: 731.6 [M+H]<sup>+</sup>, 753.6 [M+Na]<sup>+</sup>, 769.6 [M+K]<sup>+</sup>

**EA (%):** ber.: C: 54.24 H: 6.34 N: 15.33  
gef.: C: 54.00 H: 6.31 N: 15.21

### 7.7.6 Herstellung von 7-Deaza-7-(prop-2-ynyl)carbaminsäure-1-{2-[2-(2-*tert*-butoxycarbonylaminoethoxy)ethoxy]ethoxymethyl}-2-cyanoethylester-3'-*O*-(2-cyanoethyl)-2'-desoxyadenosin **187**



Der AVV 1 folgend werden 150 mg 7-Deaza-7-iodo-3'-*O*-(2-cyanoethyl)-2'-desoxyadenosin **184** (0.35 mmol, 1.0 Äq.) mit 217 mg des Alkins **181** (0.52 mmol, 1.5 Äq.) umgesetzt und mittels Flash-Säulenchromatographie aufgereinigt (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH = 99:1 bis CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH = 95:5). Es werden 168 mg (67 %) der Verbindung **187** als leicht gelber Schaum erhalten.

**R<sub>F</sub>-Wert:** 0.38 (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH = 90:10)

**<sup>1</sup>H-NMR** (400 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>, 300 K): δ = 1.363 (s, 26-H<sub>9</sub>), 2.33-2.41 (m, 2'-H), 2.52-2.60 (m, 2'-H'), 2.804 (t, 28-H<sub>2</sub>), 2.858 (dd, 15-H), 2.923 (dd, 15-H'), 3.048 (q, 23-H<sub>2</sub>), 3.352 (t, 22-H<sub>2</sub>), 3.44-3.62 (m, 5'-H<sub>2</sub>, 17-H<sub>2</sub>, 18-H<sub>2</sub>, 19-H<sub>2</sub>, 20-H<sub>2</sub>, 21-H<sub>2</sub>), 3.65-3.71 (m, 27-H<sub>2</sub>), 3.96-3.99 (m, 4'-H), 4.069 (d, 12-H<sub>2</sub>), 4.23-4.27 (m, 3'-H), 4.986 (Quintett, 14-H), 5.170 (t, 5'-OH), 6.421 (dd, 1'-H), 6.69-6.75 (m, N<sup>Boc</sup>H), 6.00-7.45 (br. s, 4-NH<sub>2</sub>), 7.733 (s, 8-H), 8.031 (t, N<sup>Carbamat</sup>H), 8.103 (s, 2-H) ppm; *J*<sub>12,NH</sub> = 5.2 Hz, *J*<sub>15,15'</sub> = 17.1 Hz

**<sup>13</sup>C-NMR** (100 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>, 300 K): δ = 18.26 (28-C), 19.73 (15-C), 28.21 (26-C), 30.97 (12-C), 36.58 (2'-C), 39.67 (23-C), 61.83 (5'-C), 63.40 (27-C), 67.93 (14-C), 69.15 (22-C), 69.46, 69.59, 69.71, 70.20, 70.29 (17-C, 18-C, 19-C, 20-C, 21-C), 75.42 (10-C), 77.59 (25-C), 79.90 (3'-C), 83.19 (1'-C), 84.71 (4'-C), 88.81 (11-C), 94.70 (7-C), 102.28 (5-C), 117.68 (16-C), 119.21 (29-C), 125.97 (8-C), 149.28 (6-C), 152.71 (2-C), 155.14 (13-C), 155.56 (24-C), 157.51 (4-C) ppm

**ESI(+)-MS (*m/z*):** ber.: 714.77 [C<sub>33</sub>H<sub>46</sub>N<sub>8</sub>O<sub>10</sub>]  
gef.: 715.8 [M+H]<sup>+</sup>

**EA (%):** ber.: C: 55.45 H: 6.49 N: 15.68  
gef.: C: 55.41 H: 6.59 N: 15.42

## 7.8 Herstellung der Fluoreszenz-markierten, reversiblen Terminatoren

### 7.8.1 AVV 2 – Herstellung der Triphosphate mit freier Aminofunktion am Linker

Das Nukleosid wird für zwei Tage in einem Schlenkkolben im Vakuum getrocknet. Der Kolben wird mit Argon geflutet und das Nukleosid in trockenem Pyridin (1 ml/mmol) und trockenem Dioxan (3 ml/mmol) gelöst. Eine frisch hergestellte 1 M Lösung von 2-Chlor-4H-1,2,3-benzodioxaphosphorin-4-on **62** (1.05 Äq. oder 1.15 Äq.) in trockenem Dioxan wird mit Hilfe einer Spritze zugegeben und die Reaktionslösung 15 Minuten bei Raumtemperatur gerührt. Es wird zunächst trockenes DMF (1.5 ml/mmol) zugegeben, anschließend werden Bis-(tri-*n*butylammonium)pyrophosphat (1.5 Äq.) als 1 M Lösung in trockenem DMF und Tri-*n*butylamine (4.35 Äq.) mit Hilfe von zwei Spritzen gleichzeitig in die Reaktionslösung eingebracht. Es wird 20 Minuten bei Raumtemperatur gerührt bevor eine 2 %ige Jod-Lösung in Pyridin/demineralisiertem Wasser = 98:2 (10 mL/mmol) zugegeben wird. Nach weiteren 20 Minuten bei Raumtemperatur wird der Überschuss an Jod mit einer 5 %igen Na<sub>2</sub>SO<sub>3</sub>-Lösung deaktiviert und die Reaktionslösung zur Trockene im Vakuum eingeeengt.

Der Rückstand wird in demineralisiertem Wasser (50 mL/mmol) aufgenommen und mit TFA (40 Äq.) versetzt. Es wird 5 bis 6 Stunden bei Raumtemperatur gerührt und die Reaktionslösung zum Entfernen des Lösungsmittels lyophilisiert.

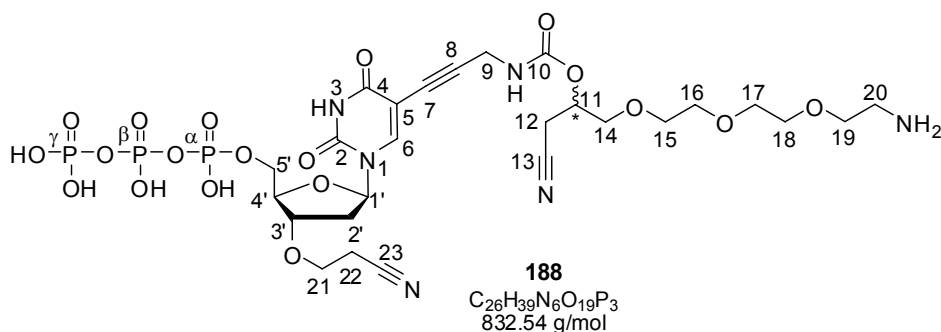
Einige Signale in den <sup>1</sup>H-NMR and <sup>13</sup>C-NMR Spektren der Triphosphate sind verdoppelt. Sie sind durch einen Schrägstrich getrennt in der Liste der Signale angegeben.

### 7.8.2 Herstellung der 1 M Bis-(tri-*n*butylammonium)pyrophosphat Lösung

In eine Säule ohne Fritte, deren Auslauf mit Glaswolle verschlossen ist, werden 100 g Ionenaustauscher (Dowex 50W X 8, mesh 200-400, H<sup>+</sup> Form) gefüllt. Das Material wird so lange mit Millipore Wasser gewaschen, bis der pH-Wert des auslaufenden Wassers neutral ist. 8.3 g Natriumpyrophosphat Decahydrat (18.6 mmol) werden in 200 ml Millipore Wasser gelöst und auf die Säule auftragen. Es wird nun so lange mit

demineralisiertem Wasser gewaschen, bis der pH-Wert des Eluats 5 beträgt (180 mL). Dabei tropft das Eluat in eine eisgekühlte Mischung aus 80 mL Ethanol und 9.5 mL (40 mmol) Tri-*n*butylamin. Das Lösungsmittel der so erhaltenen Lösung von Bis-(tri-*n*butylammonium)pyrophosphat wird im Ölpumpenvakuum entfernt. Der Rückstand wird dreimal mit trockenem Ethanol (80 mL) und einmal mit 100 mL trockenem DMF coevaporiert. Der getrocknete Rückstand wird in 18 mL trockenem DMF gelöst und über aktiviertem Molsieb (3 Å) bei 4 °C gelagert.

### 7.8.3 Herstellung von 5-(Prop-2-ynyl)carbaminsäure-1-{2-[2-(2-aminoethoxy)ethoxy]ethoxymethyl}-2-cyanoethyl-ester-3'-O-(2-cyanoethyl)-2'-desoxyuridin 5'-Triphosphat **188**



Der AVV 2 folgend werden 500 mg des Boc-geschützten Nukleosids **169** (0.72 mmol, 1.0 Äq.) umgesetzt. Die Aufreinigung erfolgt durch IA-Chromatographie bei 4 °C (Gradient IA-FPLC1) und RP-Chromatographie (Gradient: RP-HPLC2). Es werden 140 mg (23 %) des Triphosphats **188** als farbloses Öl erhalten.<sup>[368]</sup>

**R<sub>F</sub>-Wert:** 0.39 (*i*Pr/H<sub>2</sub>O/EtMe<sub>2</sub>N = 6:3.8:0.2)

**IA-FPLC:** Gradient: IA-FPLC1  
Elutionskonzentration: 0.29 M TEAB-Puffer (32 % B)

**RP-HPLC:** Gradient: RP-HPLC2  
Retentionszeit: 14.92 Min.

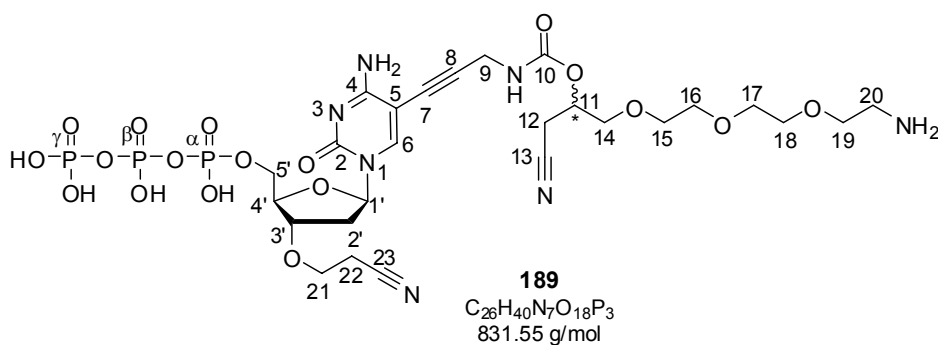
**<sup>1</sup>H-NMR** (300 MHz, D<sub>2</sub>O, 300 K): δ = 2.318 (ddd, 2'-H), 2.553 (ddd, 2'-H'), 2.810 (t, 22-H<sub>2</sub>), 2.89-2.99 (m, 12-H<sub>2</sub>), 3.250 (m, 20-H<sub>2</sub>), 3.67-3.79 (m, 14-H<sub>2</sub>, 15-H<sub>2</sub>, 16-H<sub>2</sub>, 17-H<sub>2</sub>, 18-H<sub>2</sub>, 19-H<sub>2</sub>), 3.837 (t, 21-H<sub>2</sub>), 4.12-4.26 (m, 5'-H<sub>2</sub>, 9-H<sub>2</sub>), 4.369 (br. s, 4'-H), 4.45-4.49 (m, 3'-H), 5.12-5.23 (m, 11-H), 6.262 (dd, 1'-H), 8.172 (s, 6-H) ppm; *J*<sub>2',2''</sub> = 14.5 Hz, *J*<sub>1',2'</sub> = 8.4 Hz, *J*<sub>1',2''</sub> = 5.7 Hz, *J*<sub>21,22</sub> = 6.0 Hz

**$^{13}\text{C}$ -NMR** (75 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ , 300 K):  $\delta$  = 18.91 (22-C), 20.21 (12-C), 31.49 (9-C), 37.28/37.30 (2'-C), 39.67 (21-C), 64.43 (21-C), 66.31 (d, 5'-C), 66.95, 70.09, 70.12, 70.19, 70.84, 71.18 (14-C, 15-C, 16-C, 17-C, 18-C, 19-C), 69.30 (11-C), 73.98/74.01 (7-C), 80.45/80.47 (3'-C), 84.31 (d, 4'-C), 86.50 (1'-C), 90.93 (8-C), 99.77 (5-C), 118.78 (13-C), 120.45 (23-C), 145.34/145.35 (6-C), 151.03 (2-C), 157.27/157.29 (10-C), 164.99 (4-C) ppm;  $J_{4',\alpha\text{-P}}$  = 8.8 Hz,  $J_{5',\alpha\text{-P}}$  = 5.6 Hz

**$^{31}\text{P}$ -NMR** (121 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ , 300 K):  $\delta$  = -10.901 (d,  $\gamma\text{-P}$ ), -11.616 (d,  $\alpha\text{-P}$ ), -23.272 (t,  $\beta\text{-P}$ ) ppm

**ESI(-)-MS ( $m/z$ ):** ber.: 832.54 [ $\text{C}_{26}\text{H}_{39}\text{N}_6\text{O}_{19}\text{P}_3$ ]  
gef.: 831.4 [ $\text{M}-1$ ]<sup>-</sup>, 849.6 [ $\text{M}+1+\text{NH}_4$ ]<sup>-</sup>

#### 7.8.4 Herstellung von 5-(Prop-2-ynyl)carbaminsäure-1-{2-[2-(2-*tert*-butoxycarbonylaminoethoxy)ethoxy]ethoxy-methyl}-2-cyanoethylester-3'-*O*-(2-cyanoethyl)-2'-desoxycytidin 5'-Triphosphat **189**



Der AVV 2 folgend werden 236 mg des Boc-geschützten Nukleosids **185** (0.34 mmol, 1.0 Äq.) umgesetzt. Die Aufreinigung erfolgt durch IA-Chromatographie bei 4 °C (Gradient IA-FPLC1) und RP-Chromatographie (Gradient: RP-HPLC2). Es werden 23 mg (8 %) des Triphosphats **189** als farbloses Öl erhalten.<sup>[368]</sup>

**$R_F$ -Wert:** 0.77 (RP Kieselgelpatten;  $\text{H}_2\text{O}/\text{Acetonitril}$  = 80:20)

**IA-FPLC:** Gradient: IA-FPLC1  
Elutionskonzentration: 0.31 M TEAB-Puffer (35 % B)

**RP-HPLC:** Gradient: RP-HPLC2  
Retentionszeit: 15.10 Min.

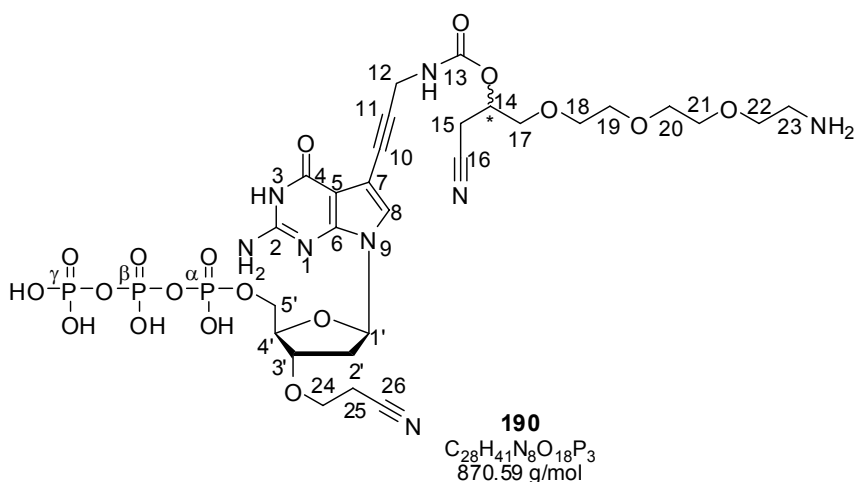
**$^1\text{H}$ -NMR** (300 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ , 300 K):  $\delta$  = 2.24-2.34 (m, 2'-H), 2.58-2.67 (m, 2'-H'), 2.858 (t, 22-H<sub>2</sub>), 2.92-2.99 (m, 12-H<sub>2</sub>), 3.23 (m, 20-H<sub>2</sub>), 3.69-3.79 (m, 14-H<sub>2</sub>, 15-H<sub>2</sub>, 16-H<sub>2</sub>, 17-H<sub>2</sub>, 18-H<sub>2</sub>, 19-H<sub>2</sub>), 3.882 (t, 21-H<sub>2</sub>), 4.18-4.30 (m, 5'-H<sub>2</sub>, 9-H<sub>2</sub>), 4.39-4.45 (m, 4'-H), 4.46-4.52 (m, 3'-H), 5.20-5.29 (m, 11-H), 6.26-6.34 (m, 1'-H), 8.224/8.229 (s, 6-H) ppm;  $J_{21,22'}$  = 5.9 Hz

$^{13}\text{C}$ -NMR (75 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ , 300 K):  $\delta$  = 18.90 (22-C), 20.18/20.21 (12-C), 31.54 (9-C), 37.82/37.91 (2'-C), 39.65 (20-C), 64.44/64.45 (21-C), 66.28 (d, 5'-C), 66.93, 70.05, 70.13, 70.18, 70.80, 71.22 (14-C, 15-C, 16-C, 17-C, 18-C, 19-C), 69.31 (11-C), 73.47 (7-C), 80.42/80.51 (3'-C), 84.29 (m, 4'-C), 87.07/87.22 (1'-C), 92.78, 93.12 (5-C, 8-C), 118.79 (13-C), 120.44 (23-C), 145.57 (6-C), 156.09/156.13 (2-C), 157.39 (10-C), 165.31 (4-C) ppm;  $J_{5',\alpha\text{-P}}$  = 6.5 Hz

$^{31}\text{P}$ -NMR (121 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ , 300 K):  $\delta$  = -10.859 (d,  $\gamma\text{-P}$ ), -11.531 (d,  $\alpha\text{-P}$ ), -23.213 (t,  $\beta\text{-P}$ ) ppm;  $J_{\alpha,\beta}$  = 20.0 Hz,  $J_{\gamma,\beta}$  = 20.0 Hz

ESI(-)-MS ( $m/z$ ): ber.: 831.55 [ $\text{C}_{26}\text{H}_{40}\text{N}_7\text{O}_{18}\text{P}_3$ ]  
gef.: 830.5 [ $\text{M}-1$ ]<sup>-</sup>

### 7.8.5 Herstellung von 7-Deaza-7-(prop-2-ynyl)carbaminsäure-1-{2-[2-(2-*tert*-butoxycarbonylaminoethoxy)ethoxy]-ethoxymethyl}-2-cyanoethylester-3'-O-(2-cyanoethyl)-2'-desoxyguanosin 5'-Triphosphat **190**



Der AVV 2 folgend werden 72 mg des Boc-geschützten Nukleosids **186** (0.099 mmol, 1.0 Äq.) umgesetzt. Die Aufreinigung erfolgt durch IA-Chromatographie bei 4 °C (Gradient IA-FPLC1) und RP-Chromatographie (Gradient: RP-HPLC2). Es werden 22 mg (26 %) des Triphosphats **190** als farbloses Öl erhalten.<sup>[368]</sup>

**R<sub>F</sub>-Wert:** 0.64 (RP Kieselgelpatten;  $\text{H}_2\text{O}$ /Acetonitril = 90:10)

**IA-FPLC:** Gradient: IA-FPLC1  
Elutionskonzentration: 0.35 M TEAB-Puffer (40 % B)

**RP-HPLC:** Gradient: RP-HPLC2  
Retentionszeit: 15.13 Min.



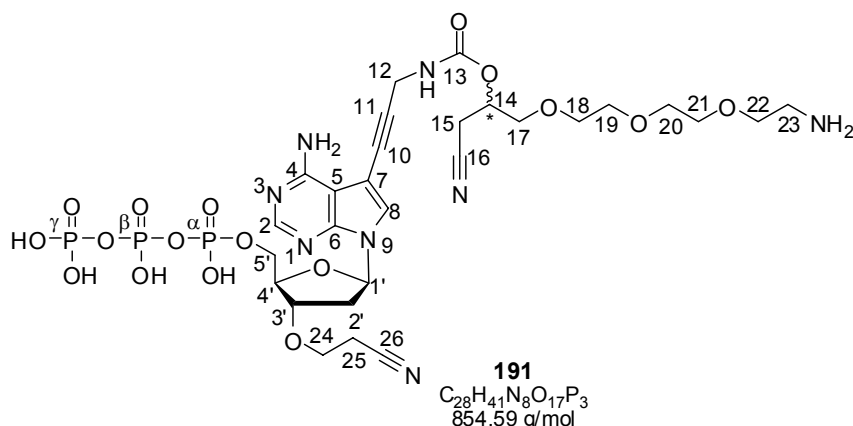
**<sup>1</sup>H-NMR** (300 MHz, D<sub>2</sub>O, 300 K):  $\delta$  = 2.522 (ddd, 2'-H), 2.58-2.70 (m, 2'-H'), 2.856 (t, 25-H<sub>2</sub>), 2.89-2.98 (m, 15-H<sub>2</sub>), 3.17 (23-H<sub>2</sub>, aus 2D-NMR, da unter Et<sub>3</sub>N-Signal), 3.55-3.80 (m, 17-H<sub>2</sub>, 18-H<sub>2</sub>, 19-H<sub>2</sub>, 20-H<sub>2</sub>, 21-H<sub>2</sub>, 22-H<sub>2</sub>), 3.85-3.93 (m, 24-H<sub>2</sub>), 4.06-4.28 (m, 5'-H<sub>2</sub>, 12-H<sub>2</sub>), 4.36 (m, 4'-H), 4.532 (br. d, 3'-H), 5.21 (m, 14-H), 6.384 (dd, 1'-H), 7.401 (s, 8-H) ppm;  $J_{1',2'} = 5.8$  Hz

**<sup>13</sup>C-NMR** (75 MHz, D<sub>2</sub>O, 300 K):  $\delta$  = 18.97 (25-C), 20.16 (15-C), 31.64 (12-C), 36.69 (2'-C), 39.56 (23-C), 64.36 (24-C), 66.50 (d, 5'-C), 66.92, 69.96, 70.10 (2C), 70.78, 71.25 (17-C, 18-C, 19-C, 20-C, 21-C, 22-C), 69.13 (14-C), 76.09 (10-C), 80.89 (3'-C), 83.63 (d, 4'-C), 83.92/83.98 (1'-C), 87.74, 99.22, 100.61 (5-C, 7-C, 11-C), 118.72 (16-C), 120.48 (26-C), 124.44/124.63 (8-C), 151.49 (4-C), 153.84, 161.23 (2-C, 6-C), 157.38/157.42 (13-C) ppm;  $J_{4'-\alpha-P} = 9.2$  Hz,  $J_{5'-\alpha-P} = 5.6$  Hz

**<sup>31</sup>P-NMR** (121 MHz, D<sub>2</sub>O, 300 K):  $\delta$  = -10.708 (d,  $\gamma$ -P), -11.395 (d,  $\alpha$ -P), -23.139 (t,  $\beta$ -P) ppm

**ESI(-)-MS ( $m/z$ ):** ber.: 870.59 [C<sub>26</sub>H<sub>40</sub>N<sub>7</sub>O<sub>18</sub>P<sub>3</sub>]  
gef.: 870.0 [M-1]<sup>-</sup>

### 7.8.6 Herstellung von 7-Deaza-7-(prop-2-ynyl)carbaminsäure-1-{2-[2-(2-*tert*-butoxycarbonylaminoethoxy)ethoxy]ethoxymethyl}-2-cyanoethylester-3'-O-(2-cyanoethyl)-2'-desoxyadenosin 5'-Triphosphat **191**



Der AVV 2 folgend werden 161 mg des Boc-geschützten Nukleosids **187** (0.23 mmol, 1.0 Äq.) umgesetzt. Die Aufreinigung erfolgt durch IA-Chromatographie bei 4 °C (Gradient IA-FPLC1) und RP-Chromatographie (Gradient: RP-HPLC2). Es werden 36 mg (19 %) des Triphosphats **191** als leicht gelbes Öl erhalten.<sup>[368]</sup>

**R<sub>F</sub>-Wert:** 0.71 (RP Kieselgelplatten; H<sub>2</sub>O/Acetonitril = 80:20)

**IA-FPLC:** Gradient: IA-FPLC1  
Elutionskonzentration: 0.34 M TEAB-Puffer (45 % B)

**RP-HPLC:**

Gradient: RP-HPLC2

Retentionszeit: 16.65 Min.

**$^1\text{H-NMR}$**  (400 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ , 300 K):  $\delta$  = 2.55-2.69 (m, 2'-H<sub>2</sub>), 2.872 (t, 25-H<sub>2</sub>), 2.92-3.04 (m, 15-H<sub>2</sub>), 3.12-3.18 (m, 23-H<sub>2</sub>), 3.49-3.81 (m, 17-H<sub>2</sub>, 18-H<sub>2</sub>, 19-H<sub>2</sub>, 20-H<sub>2</sub>, 21-H<sub>2</sub>, 22-H<sub>2</sub>), 3.904 (t, 24-H<sub>2</sub>), 4.09-4.27 (m, 5'-H<sub>2</sub>, 9-H<sub>2</sub>), 4.411 (br. s, 4'-H), 4.549 (br. s, 3'-H), 5.20-5.29 (m, 14-H), 6.546 (t, 1'-H), 7.717 (s, 8-H), 8.178 (s, 2-H) ppm;  $J_{23,24}$  = 5.8 Hz

**$^{13}\text{C-NMR}$**  (62.5 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ , 300 K):  $\delta$  = 19.01 (25-C), 20.26 (15-C), 31.66 (9-C), 36.85/37.05 (2'-C), 39.44/39.49 (23-C), 64.46 (24-C), 66.52 (d, 5'-C), 66.90/66.94, 69.82, 69.89, 70.02, 70.72/70.78, 71.24 (17-C, 18-C, 19-C, 20-C, 21-C, 22-C), 69.12/69.23 (14-C), 75.43/75.48 (10-C), 80.77/80.88 (3'-C), 83.65 (m, 4'-C), 83.82 (1'-C), 89.71 (11-C), 96.63/96.71 (7-C), 103.31 (5-C), 118.76 (16-C), 120.55 (26-C), 126.52/126.70 (8-C), 149.09/149.19 (4-C), 152.78/152.85 (2-C), 157.42 (6-C), 157.59 (13-C) ppm;  $J_{5',\alpha\text{-P}}$  = 5.8 Hz

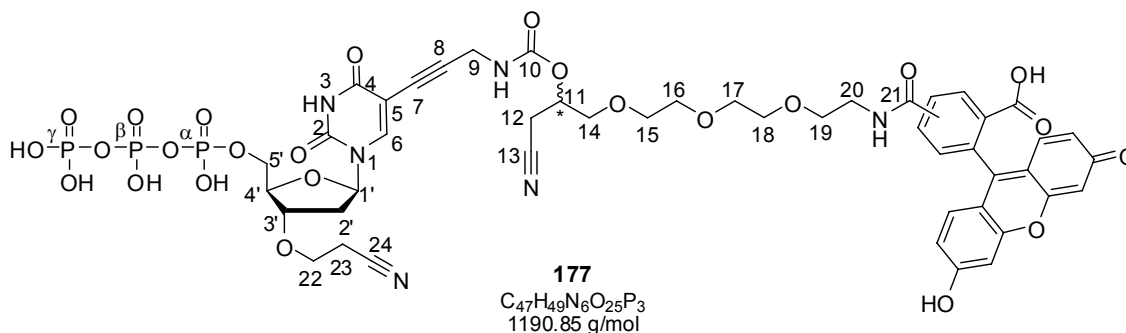
**$^{31}\text{P-NMR}$**  (121 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ , 300 K):  $\delta$  = -10.617 (d,  $\gamma\text{-P}$ ), -11.320 (d,  $\alpha\text{-P}$ ), -23.035 (t,  $\beta\text{-P}$ ) ppm

**ESI(-)-MS ( $m/z$ ):**

ber.: 854.59 [ $\text{C}_{28}\text{H}_{41}\text{N}_8\text{O}_{17}\text{P}_3$ ]

gef.: 853.6 [ $\text{M}-1$ ]<sup>-</sup>

**7.8.7 Herstellung von 3'-O-CE-5'-O-Triphosphat-5-propargyl-aminocarbamat-4-(2-(2-(2-N-5(6)-carboxyfluorescein-aminoethoxy)ethoxy)ethoxy)butannitril-2'-desoxyuridin **177****



Zu einer Lösung von 12 mg des entschützten Triphosphats **188** (0.014 mmol, 1.0 Äq.) in 500  $\mu\text{L}$  trockenem DMF werden 3 mg  $\text{KHCO}_3$  (0.03 mmol, 2.0 Äq.) zugegeben und die Mischung auf 0 °C abgekühlt. Währendessen werden 10 mg 5-(6)-Carboxyfluorescein-(*N*-hydroxysuccinimidyl)ester **172** (0.02 mmol, 1.5 Äq.) in 250  $\mu\text{L}$  trockenem DMF gelöst und dann in zwei Portionen zu dem gekühlten Reaktionsgemisch gegeben. Eine Hälfte wird direkt zugegeben, die Andere nach einer Stunde Rühren bei 0 °C. Nachdem 20 Stunden bei 0 °C gerührt wurde, wird das Lösungsmittel im Ölpumpenvakuum entfernt. Der überschüssige Farbstoff wird mittels

RP-FPLC bei 4 °C (Gradient: RP-FPLC1) abgetrennt, anschließend wird noch durch eine präparative RP-HPLC (Gradient: RP-HPLC3) gereinigt. Es werden 6 mg (34 %) des Fluorescein-markierten, reversiblen Terminators **177** als gelber Feststoff erhalten.

**R<sub>F</sub>-Wert:** 0.65 (RP Kieselgelpatten; H<sub>2</sub>O/Acetonitril = 80:20)

**RP-FPLC:** Gradient: RP-FPLC1  
Elutionskonzentration: 2.5-6 % Acetonitril

**RP-HPLC:** Gradient: RP-HPLC3  
Retentionszeit: 16.49 Min. Isomer A, 16.90 Min. Isomer B (UV-Detektion), 16.53 Min. Isomer A, 16.94 Min. Isomer B (Fluoreszenz-Detektion)

**UV<sub>max</sub>:** 494 nm, 277 nm, 235 nm

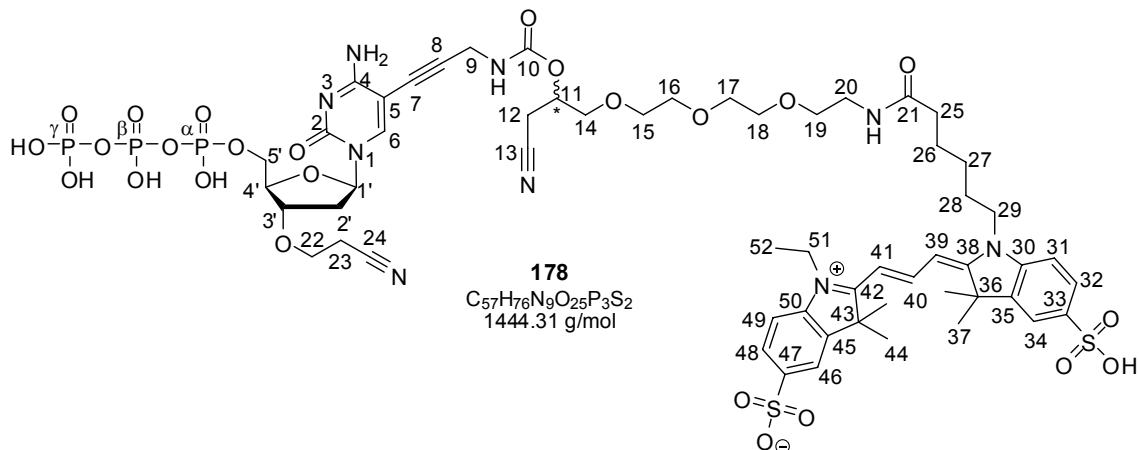
**Fluoreszenz:** Anregung 492 nm, Emission 512 nm

**<sup>1</sup>H-NMR** (250 MHz, D<sub>2</sub>O, 300 K):  $\delta$  = 2.15-2.37 (m, 2'-H), 2.44-2.59 (m, 2'-H'), 2.81-2.93 (m, 12-H<sub>2</sub>, 23-H<sub>2</sub>), 3.57-3.91 (m, 14-H<sub>2</sub>, 15-H<sub>2</sub>, 16-H<sub>2</sub>, 17-H<sub>2</sub>, 18-H<sub>2</sub>, 19-H<sub>2</sub>, 20-H<sub>2</sub>, 22-H<sub>2</sub>), 3.998 (br. s, 9-H<sub>2</sub>), 4.10-4.32 (m, 4'-H, 5'-H<sub>2</sub>), 4.10-4.32 (m, 3'-H), 4.99-5.14 (m, 11-H), 6.04-6.25 (m, 1'-H), 6.69-7.04 (m, Fluorescein-H<sub>4</sub>), 7.09-7.32 (m, Fluorescein-H<sub>2</sub>), 7.56-8.46 (m, 6-H, Fluorescein-H<sub>3</sub>) ppm

**<sup>31</sup>P-NMR** (121 MHz, D<sub>2</sub>O, 300 K):  $\delta$  = -10.561 (d,  $\gamma$ -P), -11.561 (dd,  $\alpha$ -P), -23.094 (t,  $\beta$ -P) ppm;  $J_{\alpha,\beta}$  = 19,6 Hz,  $J_{\gamma,\beta}$  = 19,6 Hz

**ESI(-)-MS (*m/z*):** ber.: 1190.85 [C<sub>47</sub>H<sub>49</sub>N<sub>6</sub>O<sub>25</sub>P<sub>3</sub>]  
gef.: 594.6 [M-2]<sup>2-</sup>, 1110.8 [M-PO<sub>3</sub>-1]<sup>-</sup>, 554.8 [M-PO<sub>3</sub>-2]<sup>2-</sup>, 1190.4 [M-1]<sup>-</sup>

### 7.8.8 Herstellung von 3'-O-CE-5'-O-Triphosphat-5-propargyl-aminocarnat-4-(2-(2-(2-N-Cy3-aminoethoxy)ethoxy)-ethoxy)butannitril-2'-desoxycytidin **178**



Zu einer Lösung von 5 mg des entschützten Triphosphats **189** (0.006 mmol, 1.0 Äq.) in 250 µL trockenem DMF werden 3 µL *N*-Ethyl-diisopropylamin (0.02 mmol, 3.0 Äq.) gegeben. 5 mg Cy3-*N*-hydroxyssuccinimidylester **192** als Monokalium Salz (0.006 mmol, 1.0 Äq.) werden in 250 µL trockenem DMF gelöst und zu der Reaktionslösung zugegeben. Nachdem 20 Stunden bei Raumtemperatur im abgedunkelten Kolben gerührt wurde, wird das Lösungsmittel im Ölpumpenvakuum entfernt. Der überschüssige Farbstoff wird mittels RP-FPLC bei 4 °C (Gradient: RP-FPLC1) abgetrennt, anschließend wird noch durch eine präparative RP-HPLC (Gradient: RP-HPLC2) gereinigt. Es werden 3 mg (36 %) des Cy3-markierten, reversiblen Terminators **178** als pinker Feststoff erhalten.

**R<sub>F</sub>-Wert:** 0.66 (RP Kieselgelpatten; H<sub>2</sub>O/Acetonitril = 80:20)

**RP-FPLC:** Gradient: RP-FPLC1  
Elutionskonzentration: 5-10 % B

**RP-HPLC:** Gradient: RP-HPLC2  
Retentionszeit: 17.74 Min. (UV-Detektion), 17.56 Min. (Fluoreszenz-Detektion)

**UV<sub>max</sub>:** 550 nm, 519 nm, 292 nm

**Fluoreszenz:** Anregung 550 nm, Emission 563 nm

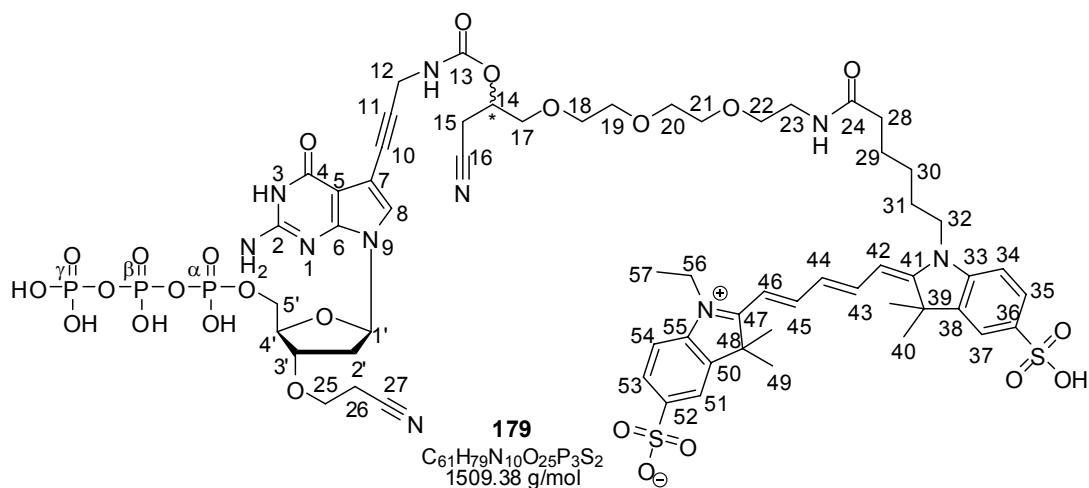
**<sup>1</sup>H-NMR** (400 MHz, D<sub>2</sub>O, 300 K): δ = 1.36 (aus 2D, 25/26/27/28-H<sub>2</sub>, 52-H<sub>3</sub>), 1.55-1.65 (m, 25/26/27/28-H<sub>2</sub>), 1.701 (s, 37-H<sub>6</sub>, 44-H<sub>6</sub>), 1.812 (br. s, 25/26/27/28-H<sub>2</sub>) 2.00-2.12

(m, 2'-H), 2.20 (m, 25/26/27/28-H<sub>2</sub>), 2.37-2.47 (m, 2'-H'), 2.667 (t, 23-H<sub>2</sub>), 2.871 (br. s, 12-H<sub>2</sub>), 3.20-3.27 (m, 20-H<sub>2</sub>), 3.39-3.68 (m, 14-H<sub>2</sub>, 15-H<sub>2</sub>, 16-H<sub>2</sub>, 17-H<sub>2</sub>, 18-H<sub>2</sub>, 19-H<sub>2</sub>), 3.704 (t, 22-H<sub>2</sub>), 4.12 (m, 5'-H<sub>2</sub>, 9-H<sub>2</sub>, 29-H<sub>2</sub>, 51-H<sub>2</sub>), 4.221 (br. s, 4'-H), 4.340 (d, 3'-H), 5.119 (m, 11-H), 6.039 („t“, 1'-H), 6.333 (t, 39-H, 41-H), 7.362 (dd, 31/32/48/49-H<sub>2</sub>), 7.79-7.85 (31/32/48/49-H<sub>2</sub>), 7.871 (s, 32-H, 46-H), 8.052 (s, 6-H), 8.456 (t, 40-H) ppm;  $J_{22,23} = 6.0$  Hz,  $J_{39,40} = 13.4$  Hz,  $J_{40,41} = 13.4$  Hz

<sup>31</sup>P-NMR (121 MHz, D<sub>2</sub>O, 300 K):  $\delta = -10.174$  (d,  $\gamma$ -P),  $-11.399$  (d,  $\alpha$ -P),  $-22.552$  (m,  $\beta$ -P) ppm

ESI(-)-MS ( $m/z$ ): ber.: 1444.31 [C<sub>57</sub>H<sub>76</sub>N<sub>9</sub>O<sub>25</sub>P<sub>3</sub>S<sub>2</sub>]  
gef.: 480.4 [M-3]<sup>3-</sup>, 721.0 [M-2]<sup>2-</sup>, 681.0 [M-PO<sub>3</sub>-2]<sup>2-</sup>,  
453.5 [M-PO<sub>3</sub>-3]<sup>2-</sup>, 732.1 [M+Na-2]<sup>2-</sup>

### 7.8.9 Herstellung von 3'-O-CE-5'-O-Triphosphat-7-deaza-7-propargylaminocarbamat-4-(2-(2-(2-N-Cy5-aminoethoxy)ethoxy)ethoxy)butannitril-2'-desoxyguanosin **179**



Zu einer Lösung von 5 mg des entschützten Triphosphats **190** (0.006 mmol, 1.0 Äq.) in 250  $\mu$ L trockenem DMF werden 4  $\mu$ L *N*-Ethyldiisopropylamin (0.023 mmol, 4.0 Äq.) zugegeben. 5 mg Cy5-*N*-hydroxyssuccinimidylester **193** als Monokalium Salz (0.006 mmol, 1.0 Äq.) werden in 250  $\mu$ L trockenem DMF gelöst und zu der Reaktionslösung zugegeben. Nachdem 20 Stunden bei Raumtemperatur im abgedunkelten Kolben gerührt wurde, wird das Lösungsmittel im Ölpumpenvakuum entfernt. Der überschüssige Farbstoff wird mittels RP-FPLC bei 4 °C (Gradient: RP-FPLC1) abgetrennt, anschließend wird noch durch eine präparative RP-HPLC (Gradient: RP-HPLC3) gereinigt. Es werden 1.5 mg (17 %) des Cy5-markierten, reversiblen Terminators **179** als dunkelblauer Feststoff erhalten.

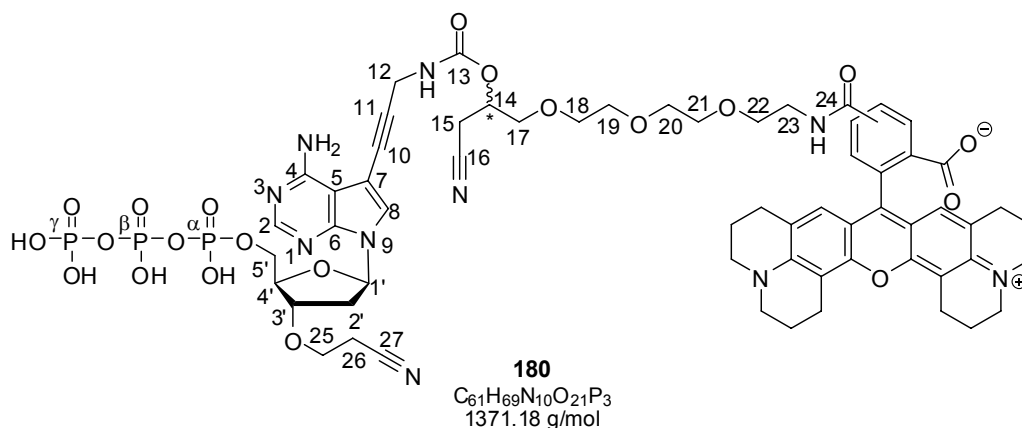
<b>R<sub>F</sub>-Wert:</b>	0.38 (RP Kieselgelpatten; H <sub>2</sub> O/Acetonitril = 90:10)
<b>RP-FPLC:</b>	Gradient: RP-FPLC1 Elutionskonzentration: 5-10 % B
<b>RP-HPLC:</b>	Gradient: RP-HPLC3 Retentionszeit: 18.55 Min. (UV-Detektion), 18.68 Min. (Fluoreszenz-Detektion)
<b>UV<sub>max</sub>:</b>	648 nm, 605 nm, 319 nm, 245 nm
<b>Fluoreszenz:</b>	Anregung 646 nm, Emission 666 nm

**<sup>1</sup>H-NMR** (400 MHz, D<sub>2</sub>O, 300 K):  $\delta$  = 1.37 (aus 2D, 28/29/30/31-H<sub>2</sub>, 57-H<sub>3</sub>), 1.61-1.69 (m, 28/29/30/31-H<sub>2</sub>), 1.728, 1.738 (s, 40-H<sub>6</sub>, 49-H<sub>6</sub>), 1.78-1.86 (m, 28/29/30/31-H<sub>2</sub>), 2.270 (t, 28/29/30/31-H<sub>2</sub>), 2.439 (dd, 2'-H), 2.60-2.72 (m, 2'-H'), 2.78-2.90 (m, 15-H<sub>2</sub>, 29-H<sub>2</sub>), 3.32 (m, 23-H<sub>2</sub>), 3.54-3.70 (m, 17-H<sub>2</sub>, 18-H<sub>2</sub>, 19-H<sub>2</sub>, 20-H<sub>2</sub>, 21-H<sub>2</sub>, 22-H<sub>2</sub>), 3.76-3.89 (m, 25-H<sub>2</sub>), 3.93-4.28 (m, 5'-H<sub>2</sub>, 12-H<sub>2</sub>, 32-H<sub>2</sub>, 56-H<sub>2</sub>), 4.353 (br. s, 4'-H), 4.552 (d, 3'-H), 5.04 (m, 17-H), 6.18-6.45 (m, 1'-H, 42/43/44/45/46-H<sub>2</sub>), 6.584 (t, 42/43/44/45/46-H<sub>1</sub>), 7.301, 7.377 (d, 34-H, 54-H), 7.74-8.29 (8-H, 35-H, 37-H, 42/43/44/45/46-H<sub>2</sub>, 51-H, 53-H) ppm

**<sup>31</sup>P-NMR** (121 MHz, D<sub>2</sub>O, 300 K):  $\delta$  = -9.803 (br. s,  $\gamma$ -P), -11.325 (d,  $\alpha$ -P), -22.421 (br. s,  $\beta$ -P) ppm

**ESI(+)-MS (*m/z*):** ber.: 1509.38 [C<sub>61</sub>H<sub>79</sub>N<sub>10</sub>O<sub>25</sub>P<sub>3</sub>S<sub>2</sub>]  
gef.: 508.1 [M+NH<sub>4</sub>]<sup>3+</sup>, 722.9 [M-PO<sub>4</sub>+Na]<sup>2-</sup>

### 7.8.10 Herstellung von 3'-O-CE-5'-O-Triphosphat-7-deaza-7-propargylaminocarbamat-4-(2-(2-(2-*N*-5(6)-carboxy-TexasRed-aminoethoxy)ethoxy)ethoxy)butannitril-2'-desoxyadenosin **180**



Zu einer Lösung von 20 mg des entschützten Triphosphats **191** (0.023 mmol, 1.0 Äq.) in 500  $\mu$ L trockenem DMF werden 12  $\mu$ L *N*-Ethyl-diisopropylamin (0.07 mmol, 3.0 Äq.)

gegeben. 30 mg 5-(6)-CarboxyTexasRed-(*N*-hydroxyssuccinimidyl)ester **194** (0.05 mmol, 2.0 Äq.) werden in 500 µL trockenem DMF gelöst und in zwei Portionen zu der Reaktionslösung gegeben. Eine Hälfte wird direkt zugegeben, die Andere nach einer Stunde Rühren bei Raumtemperatur. Nachdem 20 Stunden bei Raumtemperatur gerührt wurde, wird das Lösungsmittel im Ölpumpenvakuum entfernt. Der überschüssige Farbstoff wird mittels RP-FPLC bei 4 °C (Gradient: RP-FPLC1) abgetrennt, anschließend wird noch durch eine präparative RP-HPLC (Gradient: RP-HPLC2) gereinigt. Es wurden 5 mg (16 %) des TexasRed-markierten, reversiblen Terminators **180** als dunkelroter Feststoff erhalten.

**R<sub>F</sub>-Wert:** 0.52 (RP Kieselgelplatten; H<sub>2</sub>O/Acetonitril = 50:50)

**RP-FPLC:** Gradient: RP-FPLC1  
Elutionskonzentration: 13-100 % B

**RP-HPLC:** Gradient: RP-HPLC2  
Retentionszeit: 18.87 Min. (UV-Detektion), 19.06 Min. (Fluoreszenz-Detektion)

**UV<sub>max</sub>:** 594 nm, 552 nm, 374 nm, 271 nm

**Fluoreszenz:** Anregung 592 nm, Emission 610 nm

**<sup>1</sup>H-NMR** (400 MHz, D<sub>2</sub>O, 300 K): δ = 1.55-2.13 (H<sub>9</sub>), 2.22-3.11 (H<sub>20</sub>), 3.33-4.32 (H<sub>22</sub>), 4.38-4.58 (H<sub>1</sub>) (jedes Signal m, 2'-H<sub>2</sub>, 3'-H, 4'-H, 5'-H<sub>2</sub>, 12-H<sub>2</sub>, 15-H<sub>2</sub>, 17-H<sub>2</sub>, 18-H<sub>2</sub>, 19-H<sub>2</sub>, 20-H<sub>2</sub>, 21-H<sub>2</sub>, 22-H<sub>2</sub>, 23-H<sub>2</sub>, 25-H<sub>2</sub>, 26-H<sub>2</sub>, Texas Red-H<sub>24</sub>,aliphatisch), 4.96-5.21 (m, 14-H), 5.92-8.81 (m, 1'-H, 2-H, 8-H, Texas Red-H<sub>5</sub>,aromatisch) ppm

**<sup>31</sup>P-NMR** (121 MHz, D<sub>2</sub>O, 300 K): δ = -10.735 (d, γ-P), -11.508 (d, α-P), -23.103 (m, β-P) ppm

**ESI(+)-MS (*m/z*):** ber.: 1371.18 [C<sub>61</sub>H<sub>69</sub>N<sub>10</sub>O<sub>21</sub>P<sub>3</sub>]  
gef.: 684.40 [M-2]<sup>2-</sup>, 1370.4 [M-H]<sup>-</sup>

## 7.9 Spaltungsexperimente mit der Fluorid-spaltbaren Modellverbindung **147** und dem modifizierten Nukleosid **160**

Für die Stabilitäts- und Spaltungstests mit der Modellverbindung **147** wurden 30 mg eingewogen und in dem in Tabelle 7-8 angegebenen Gesamtvolumen gelöst. Die Temperaturen und Gesamtreaktionszeiten sind ebenfalls angegeben.

**Tabelle 7-8:** Reaktionsparameter der Spaltungsexperimente mit der Modellverbindung **147**.

#	Reagenz (Äq.)	Lösungsmittel	Volumen [mL]	T	t
1	1 M TBAF (50)	abs. THF	4	60 °C	30 Min.
2	1 M TBAF (50)	abs. THF	4	RT	30 Min.
3	1 M TBAF (5)	abs. THF	5	RT	30 Min.
4	28 % aq. NH <sub>3</sub> (100)	MeOH	2	RT	18 h
5	Et <sub>3</sub> N·3HF (5)	abs. THF	2	RT	20 h
6	aq. TFA (40)	MeOH	2	RT	48 h

Zur Verfolgung der Reaktionen wurden 100 µL Proben entnommen, mit 450 µL Methanol und 50 µL Millipore Wasser verdünnt und 10 µL davon auf die RP-HPLC gegeben. Die Analysen wurden mit der Methode RP-HPLC11 durchgeführt (siehe 7.1.2). Bei den Einträgen #1-#3 wurden während der ersten zehn Minuten jede Minute eine Probe entnommen, dann alle fünf Minuten. Bei den Einträgen #4-#6 wurden bis zwei Stunden Reaktionszeit alle 30 Minuten, dann nach sechs Stunden, nach 18 bzw. 20 Stunden und bei #6 noch mal nach 48 Stunden.

Für die Stabilitäts- und Spaltungstests mit dem Linker- und 3'-O-CE-modifizierten Nukleosid **160** wurden ebenfalls 30 mg eingewogen und in dem in Tabelle 7-9 angegebenen Gesamtvolumen gelöst. Die Reaktionen wurden bei Raumtemperatur durchgeführt, die Gesamtreaktionszeit ist in Tabelle 7-9 angegeben.



**Tabelle 7-9:** Reaktionsparameter der Spaltungsexperimente mit dem modifizierten Nukleosid **160**.

#	Reagenz (Äq.)	Lösungsmittel	Volumen [mL]	t [h]
1	1 M TBAF (55)	abs. THF	3	16
2	25 % aq. NH <sub>3</sub> (450)	-	1.5	16

Zur Verfolgung der Reaktionen wurden 100 µL Proben entnommen, mit 450 µL Methanol und 50 µL Millipore Wasser verdünnt und 10 µL davon auf die RP-HPLC gegeben. Die Analysen wurden mit der Methode RP-HPLC12 durchgeführt (siehe 7.1.2). Bei beiden Reaktionen wurde während der ersten zehn Minuten jede Minute eine Probe entnommen, dann bis 30 Minuten alle fünf Minuten, nach 45 Minuten und nach einer, zwei und 16 Stunden.

## 7.10 Oligonukleotidsynthesen

Die Oligonukleotidsynthesen wurden unter Verwendung der Phosphoramiditmethode<sup>[9-11]</sup> an einem PerSeptive Biosystems Synthesizer, Modell Expedite 8905 durchgeführt. Mit diesem Gerät bestand die Möglichkeit, die Abspaltung der Dimethoxytritylgruppen über einen „Trityl-Monitor“ zu quantifizieren und damit die Effizienz der einzelnen Kupplungsschritte zu überprüfen. Zum Lösen der Phosphoramidite und der Reagenzien wurde trockenes ( $\text{H}_2\text{O} < 0.001\%$ ) Acetonitril zur DNA Synthese der PerSeptive Biosystems verwendet. Die kommerziell erhältlichen Phosphoramidite, sowie die modifizierten Phosphoramidite wurden als 0.1 M Lösungen in trockenem Acetonitril eingesetzt. Pro Kupplungsschritt werden 40 mg des Amidits eingesetzt. Außerdem werden weitere 40 mg für den Primevorgang benötigt und weitere 150 mg um eine ausreichende Flaschenfüllung zu gewährleisten.

### 7.10.1 Aufreinigung der Oligonukleotide und Bestimmung der Ausbeute

Die Aufreinigung erfolgte im Fall der mit der schutzgruppenfreien Methode synthetisierten Oligonukleotide mit Phosphorthioat Rückgrat mittels RP-HPLC (Gradient: RP-HPLC5) und Entsalzen durch Gelfiltration über NAP<sup>TM</sup> Entsalzungssäulen der Fa. GE Healthcare.

Im Fall des in 5'→3' Richtung synthetisierten Oligonukleotids mit unmodifiziertem Phosphatrückgrat erfolgte die Aufreinigung durch IA-HPLC (Gradient IA-HPLC1) und anschließendem Entsalzen durch Gelfiltration über PD-10<sup>TM</sup> Entsalzungssäulen der Fa. GE Healthcare.

Zur Bestimmung der Ausbeute wird die optische Dichte bei  $\lambda = 260\text{ nm}$  ermittelt. Hierfür wird die entsalzte DNA-Probe in 1 mL Millipore Wasser gelöst und 10  $\mu\text{L}$  dieser Lösung in einer Quarzküvette (Schichtdicke  $d = 1\text{ cm}$ ) mit Millipore Wasser auf 1 mL Gesamtmenge aufgefüllt. Die Extinktion dieser Lösung wird dann UV-photometrisch bestimmt und der abgelesene Wert mit dem Verdünnungsfaktor 100 multipliziert. Auf diese Weise erhält man die Menge an DNA der jeweiligen Probe als  $\text{OD}_{260}$ . Aus der optischen Dichte lässt sich mit Hilfe des Lambert-Beer'schen Gesetzes (Gleichung 7-1) die Konzentration des Oligonukleotids berechnen.

$$c = OD_{260} / \varepsilon \cdot d$$

**Gleichung 7-1:** Lambert-Beer'sche Gleichung,  $c$  = Konzentration der DNA in mmol/L,  $OD_{260}$  = optische Dichte der Probe bei 260 nm,  $\varepsilon$  = Extinktionskoeffizient,  $d$  = Schichtdicke.

Dabei kann der Extinktionskoeffizient in guter Näherung als die Summe der Extinktionskoeffizienten der einzelnen Nukleotide angesehen werden. Für Desoxyribonukleotide gilt der in Gleichung 7-2 angegebene Zusammenhang.<sup>[369]</sup>

$$\varepsilon = (8.8 \cdot nT + 7.3 \cdot nC + 11.7 \cdot nG + 15.4 \cdot nA) \cdot 0.9 \quad [1000 \cdot \text{cm}^2 \cdot \text{mmol}^{-1}]$$

**Gleichung 7-2:** Berechnung des Extinktionskoeffizienten  $\varepsilon$  als Summe der Extinktionskoeffizienten der einzelnen Nukleobasen des Oligonukleotids,  $\varepsilon$  = Extinktionskoeffizient,  $nN$  = Anzahl der jeweiligen Nukleobase im Oligonukleotid.

Der Faktor 0.9 in Gleichung 7-2 berücksichtigt die Absorptionsverminderung durch den Einfluss der Basenstapelwechselwirkungen.

Für das mit dem Fluorid-spaltbaren Linker modifizierte Nukleosid **169** wird der Koeffizient der zugrunde liegenden Nukleobase (2'-Desoxythymidin) angenommen. Für das mit dem enzymatisch spaltbaren Linker modifizierte Nukleosid **111** wurde der Extinktionskoeffizient aus dem UV Spektrum von Verbindung **111** bestimmt. Dazu wurden 2 UV-Spektren bei verschiedenen Konzentrationen (0.0078 mmol/L und 0.0391 mmol/L) aufgenommen und mit Hilfe des Lambert-Beer'schen Gesetzes die Extinktionskoeffizienten berechnet. Unter der Annahme, dass  $\varepsilon$  in diesem Konzentrationsbereich linear von der Konzentration abhängt, wurde der Mittelwert verwendet.

**Tabelle 7-10:** Bestimmung des Extinktionskoeffizienten für Verbindung **111** aus zwei UV-Spektren.

Konzentration [mmol/L]	0.0078	0.0391
Absorption bei 260 nm	0.1431	0.6945
Schichtdicke [cm]	1	1
Extinktionskoeffizient [ $\text{cm}^2 \cdot 1000 \cdot \text{mmol}^{-1}$ ]	18.34	17.7
Mittelwert [ $\text{cm}^2 \cdot 1000 \cdot \text{mmol}^{-1}$ ]	18.05	

So wurde der Wert des Extinktionskoeffizienten für Verbindung **111** zu  $18.05 \text{ cm}^2 \cdot 1000 \cdot \text{mmol}^{-1}$  bestimmt.

### 7.10.2 Schutzgruppenfreie Oligonukleotidsynthese

Die schutzgruppenfreie Oligonukleotidsynthese wurde nach einer von *Ohkubo et al.* beschriebenen Methode durchgeführt.<sup>[329]</sup> Bei dieser Methode wird Benzimidazolium Triflat (BIT) **54** als Aktivator verwendet, das nach einer Literaturvorschrift synthetisiert wurde (siehe Kapitel 7.10.3.7).<sup>[346]</sup> Zum Spalten der unerwünschten P-N-Bindungen wird 1-Hydroxy-6-nitrobenzotriazol **58** eingesetzt, welches ebenfalls entsprechend der Literaturvorschrift synthetisiert wurde (siehe Kapitel 7.10.3.6).<sup>[347]</sup> Um die kommerziell erhältlichen 3'-Phosphoramidite in dieser Methode einsetzen zu können müssen die Amino-Schutzgruppen entfernt werden. Die Abspaltung erfolgte nach dem ebenfalls von *Ohkubo et al.* veröffentlichten Protokoll<sup>[330]</sup> und ist in den Kapiteln 7.10.3.2 bis 7.10.3.5 beschrieben. Als Trägermaterial für die schutzgruppenfreie Oligonukleotid Synthese wird ein Polystyrol Trägermaterial **123** verwendet das mit einem Fluorid-spaltbaren (Et<sub>3</sub>N·3HF) Silyl-Linker<sup>[88]</sup> und dem ersten Baustein 2'-Desoxycytidin beladen ist (14 µmol/g). Dieses Material wurde von *Dr. Akihiro Ohkubo*, einem Mitarbeiter der Arbeitsgruppe von *Prof. Mitsuo Sekine*, synthetisiert und zur Verfügung gestellt.

Das Protokoll für die automatisierte Festphasensynthese wurde entsprechend den Anforderungen der schutzgruppenfreien Methode und der Synthese von Vollthioaten modifiziert.

#### Verwendete Reagenzien:

- 0.1 M Lösungen der Phosphoramidite **129**, **130**, **131**, Thymidin 3'-Phosphoramidit, LNA-Thymidin 3'-Phosphoramidit sowie des modifizierten Phosphoramidits **125** in trockenem Acetonitril
- 0.2 M Lösung von Benzimidazolium Triflat **54** in trockenem Acetonitril
- 0.1 M Lösung von 1-Hydroxy-6-nitrobenzotriazol **58** in trockenem Acetonitril/*N*-Methyl-2-pyrrolidon = 15:1
- 0.05 M Lösung des Beaucage Reagenz **52** in trockenem Acetonitril
- 3 %ige TCA-Lösung in trockenem Dichlormethan (Deblock-Lösung, Perseptive Biosystems)

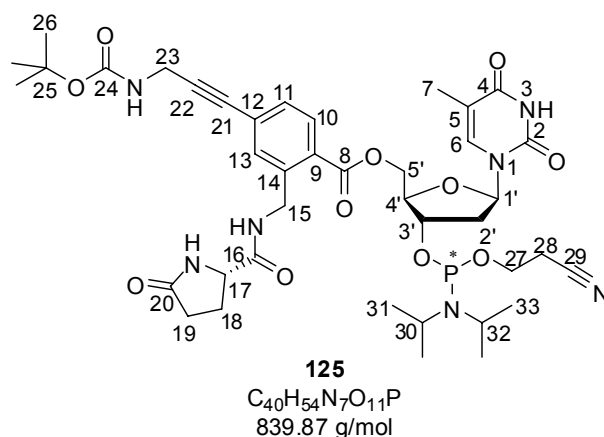
**Tabelle 7-11:** Protokoll zur Synthese der Oligonukleotide **122** und **141**.

Funktion	Reagenzien	Protokoll 122		Protokoll 141	
		Menge (Pulse/ $\mu$ L)	t [Sek.]	Menge (Pulse/ $\mu$ L)	t [Sek.]
Deblocking	3 % TCA/ $\text{CH}_2\text{Cl}_2$	10/160	0	25/160	0
		50/800	49	125/2000	49
		40/640	0	100/1600	0
Waschschritte	ACN	40/640	0	100/1600	0
		5/80	0	20/320	0
Spülen mit Aktivator	0.2 M BIT/ACN	5/80	0	15/240	0
spülen mit Monomer/Aktivator	0.1 M Amidit/ACN + 0.2 M BIT/ACN	6/96	0	15/240	0
Kuppeln	0.1 M Amidit/ACN + 0.2 M BIT/ACN	6/96	60	15/240	60(75) <sup>[a]</sup>
		6/96	60	15/240	60(300) <sup>[a]</sup>
Waschen	ACN	-	-	50/800	0
Spülen mit P-N Spaltungsreagenz	0.1 M $\text{HO}^n\text{Bt}$ /ACN-NMP (15:1, v/v)	6/96	0	20/320	0
P-N-Bindungsspaltung	0.1 M $\text{HO}^n\text{Bt}$ /ACN-NMP (15:1, v/v)	12/192	120	60/960	120
Waschen	ACN	40/640	0	100/1600	0
Oxidation	0.05 M Beaucage-Reagenz <b>52</b> /ACN	15/240	0	50/800	0
		6/96	60	15/240	80
Waschschritte	ACN	40/640	0	125/2000	0

<sup>[a]</sup>Die Kupplungszeit in Klammern ist die verlängerte Kupplungszeit für das modifizierte Phosphoramidit **125**.

### 7.10.3 Herstellung der benötigten Reagenzien und Phosphoramidite für die schutzgruppenfreie Oligonukleotidsynthese

#### 7.10.3.1 Herstellung von 5'-Amino-N-[2-(aminomethyl-N-(S)-pyroglutamyl)4-(*tert*-butoxycarbonylamino-prop-2-ynyl)benzoat]-2'-desoxythymidin 3'-Phosphoramidit **125**



Unter inerten Bedingungen werden 300 mg 5'-Amino-N-[2-(aminomethyl-N-(S)-pyroglutamyl)4-(*tert*-butoxycarbonylamino-prop-2-ynyl)benzoat]-2'-desoxythymidin **111** (0.47 mmol, 1.0 Äq.) in 50 mL trockenem Acetonitril suspendiert. Zu der Suspension werden 0.22 mL *N,N,N,N*-Tetraisopropyl-*O*-cyanoethyl-phosphoramidit **124** (0.70 mmol, 1.5 Äq.) und 62 mg Dicyanoimidazol (0.52 mmol, 1.1 Äq.) geben und sechs Stunden bei Raumtemperatur gerührt. Danach werden noch mal 0.07 mL *N,N,N,N*-Tetraisopropyl-*O*-cyanoethyl-phosphoramidit **124** (0.23 mmol, 0.5 Äq.) und 22 mg 4,5-Dicyanoimidazol (0.19 mmol, 0.4 Äq.) zugegeben und weiter 12 Stunden bei Raumtemperatur gerührt. Das Lösungsmittel wird im Vakuum entfernt und der Rückstand in 50 mL Dichlormethan aufgenommen. Die organische Phase wird in einen Scheidetrichter mit 25 mL gesättigter  $NH_4Cl$ -Lösung gegossen, die Phasen dreimal kurz geschüttelt und dann sofort wieder getrennt. Die organische Phase wird fünf Minuten lang über  $Na_2SO_4$  getrocknet, wobei nicht gerührt, sondern nur vorsichtig geschwenkt wird. Die Lösung wird abfiltriert und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Das Rohprodukt wird über eine kurze Säule durch Flash-Säulenchromatographie gereinigt ( $CH_2Cl_2$ /Essigester/  $EtMe_2N$  = 3:1: 0.1 bis  $CH_2Cl_2$ /Methanol/ $EtMe_2N$  = 90:10: 0.5) und es werden 187 mg (48 %) des Phosphoramidits **125** als leicht gelber Schaum erhalten.

**R<sub>F</sub>-Wert:** 0.41 ( $CH_2Cl_2$ /MeOH = 90:10)

**<sup>1</sup>H-NMR** (400 MHz, Aceton-d<sub>6</sub>, 300 K):  $\delta$  = 1.202, 1.217 (s, 31-H<sub>6</sub>, 33-H<sub>6</sub>), 1.431 (s, 26-H<sub>9</sub>), 1.680 (s, 7-H<sub>3</sub>), 2.08-2.66 (m, 2'-H<sub>2</sub>, 18-H<sub>2</sub>, 19-H<sub>2</sub>), 2.75-2.89 (m, 28-H<sub>2</sub>), 3.49-3.98, 4.04-4.86 (m, 3'-H, 4'-H, 5'-H<sub>2</sub>, 15-H<sub>2</sub>, 17-H, 23-H<sub>2</sub>, 27-H<sub>2</sub>, 30-H, 32-H), 6.30-6.41 (m, 1'-H), 6.515 (br s, 23-NH), 7.38-7.65 (m, 6-H, 11-H, 13-H, 17-NH), 7.90-8.05 (m, 10-H, 15-NH), 9.680 (br. s, N<sup>3</sup>H) ppm

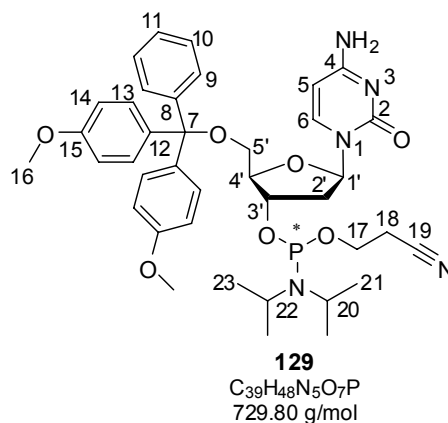
**<sup>31</sup>P-NMR** (161 MHz, Aceton-d<sub>6</sub>, 300 K):  $\delta$  = 148.512 (s), 148.638 (s) ppm

**ESI(+)-MS (*m/z*):**  
ber.: 839.87 [C<sub>40</sub>H<sub>54</sub>N<sub>7</sub>O<sub>11</sub>P]  
gef.: 858.9 [M+NH<sub>4</sub>]<sup>+</sup>

### 7.10.3.2 AVV 3 – Herstellung der entschützten Phosphoramidite

Der Literaturvorschrift<sup>[330]</sup> folgend werden die kommerziell erhältlichen *N*-geschützten Phosphoramidite unter inerten Bedingungen zu einer gesättigten ethanolischen Ammoniak-Lösung oder einer 2 M Dimethylamin-Lösung in THF gegeben (10 mL/mmol Phosphoramidit) und eine bis drei Stunden bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend wird das Lösungsmittel im Vakuum entfernt und der Rückstand mittels Flash-Säulenchromatographie gereinigt.

### 7.10.3.3 Herstellung von 3'-[(2-Cyanoethyl)-(N,N-diisopropyl)]phosphoramidit-5'-(4,4-dimethoxytrityl)-2'-desoxycytidin **129**



Entsprechend der AVV 3 werden 5 g (6.48 mmol) 3'-[(2-Cyanoethyl)-(N,N-diisopropyl)]phosphoramidit-5'-(4,4-dimethoxytrityl)-*N*-acetyl-2'-desoxycytidin **126** in 65 mL einer gesättigten, ethanolischen Ammoniak-Lösung gegeben, drei Stunden bei Raumtemperatur gerührt und dann mittels Flash-Säulenchromatographie (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/Et<sub>3</sub>N = 100:1 bis CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH/Et<sub>3</sub>N = 98:2:1) gereinigt. Es werden 2.5 g (53 %) der entschützten Verbindung **129** als leicht gelblicher Schaum erhalten.

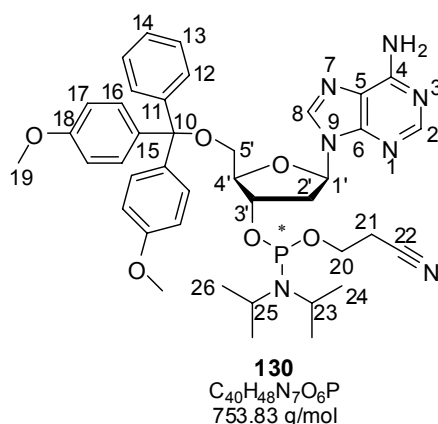
**R<sub>F</sub>-Wert:** 0.14 (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH/EtMe<sub>2</sub>N = 95:5:1)

**<sup>1</sup>H-NMR** (400 MHz, (CD<sub>3</sub>)<sub>2</sub>O, 300 K): δ = 1.099 (d, 21/23-H<sub>2</sub>), 1.191 (t, 21/23-H<sub>10</sub>), 2.24-2.33 (m, 2'-H), 2.50 (m, 2'-H'), 2.636 (t, 18-H<sub>2</sub>), 3.36-3.50 (m, 5'-H<sub>2</sub>), 3.58-3.77 (m, 17-H<sub>2</sub>, 20-H, 22-H), 3.78-3.80 (m, 16-H<sub>6</sub>), 4.12-4.21 (m, 4'-H), 4.64-4.75 (m, 3'-H), 5.73-5.77 (m, 5-H), 6.29-6.38 (m, 1'-H), 6.87-6.94, 7.21-7.43, 7.46-7.54 (m, 9-H<sub>2</sub>, 10-H<sub>2</sub>, 11-H, 13-H<sub>4</sub>, 14-H<sub>4</sub>), 7.78-7.88 (m, 6-H) ppm

**<sup>31</sup>P-NMR** (121 MHz, (CD<sub>3</sub>)<sub>2</sub>O, 300 K): δ = 148.141, 148.248 ppm

**ESI(+)-MS (*m/z*):**  
ber.: 729.80 [C<sub>39</sub>H<sub>48</sub>N<sub>5</sub>O<sub>7</sub>P]  
gef.: 730.9 [M+H]<sup>+</sup>

#### 7.10.3.4 Herstellung von 3'-[(2-Cyanoethyl)-(N,N-diisopropyl)]phosphoramidit-5'-(4,4-dimethoxytrityl)-2'-desoxyadenosin **130**



Entsprechend der AVV 3 werden 4.7 g (5.29 mmol) 3'-[(2-Cyanoethyl)-(N,N-diisopropyl)]phosphoramidit-5'-(4,4-dimethoxytrityl)-N-phenoxycetyl-2'-desoxyadenosin **127** in 53 mL einer 2 M Dimethylamin-Lösung in THF gegeben, eine Stunde bei Raumtemperatur gerührt und dann mittels Flash-Säulenchromatographie (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/Et<sub>3</sub>N = 100:1 bis CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH/Et<sub>3</sub>N = 98:2:1) gereinigt. Es werden 4.0 g (100 %) der entschützten Verbindung **130** als farbloser Schaum erhalten.

**R<sub>F</sub>-Wert:** 0.39 (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH/EtMe<sub>2</sub>N = 95:5:1)

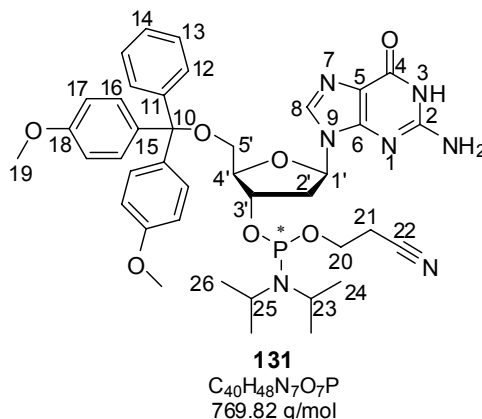
**<sup>1</sup>H-NMR** (400 MHz, (CD<sub>3</sub>)<sub>2</sub>O, 300 K): δ = 1.151 (d, 24/26-H<sub>3</sub>), 1.18-1.25 (m, 24/26-H<sub>9</sub>), 2.54-2.70 (m, 2'-H, 21-H), 2.775 (t, 21-H'), 3.13-3.23 (m, 2'-H'), 3.32-3.49 (m, 5'-H<sub>2</sub>), 3.60-3.74 (m, 23-H, 25-H), 3.772 (s, 19-H<sub>6</sub>), 3.73-3.97 (m, 20-H<sub>2</sub>), 4.20-4.31 (m, 4'-H), 4.88-5.01 (m, 3'-H), 6.43-6.51 (m, 1'-H), 6.648 (s, 4-NH<sub>2</sub>), 6.77-6.87, 7.29-7.38, 7.42-7.49 (m, 12-H<sub>2</sub>, 13-H<sub>2</sub>, 14-H, 16-H<sub>4</sub>, 17-H<sub>4</sub>), 8.11-8.19 (m, 2-H, 8-H) ppm

**<sup>31</sup>P-NMR** (121 MHz, (CD<sub>3</sub>)<sub>2</sub>O, 300 K): δ = 148.109, 148.217 ppm

**ESI(+)-MS (*m/z*):**  
ber.: 753.83 [C<sub>40</sub>H<sub>48</sub>N<sub>7</sub>O<sub>6</sub>P]  
gef.: 754.9 [M+H]<sup>+</sup>



### 7.10.3.5 Herstellung von 3'-[(2-Cyanoethyl)-(N,N-diisopropyl)]phosphoramidit-5'-(4,4-dimethoxytrityl)-2'-desoxyguanosin **131**



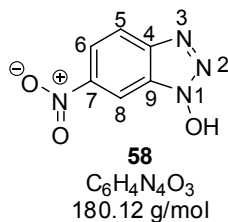
Entsprechend der AVV 3 werden 4.9 g (5.18 mmol) 3'-[(2-Cyanoethyl)-(N,N-diisopropyl)]-phosphoramidite-5'-(4,4-dimethoxytrityl)-N-pisopropyl-phenoxyacetyl-2'-desoxyguanosin **128** in 50 mL einer 2 M Dimethylamin-Lösung in THF gegeben, zwei Stunden bei Raumtemperatur gerührt und dann mittels Flash-Säulenchromatographie (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/Et<sub>3</sub>N = 100:1 bis CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH/ Et<sub>3</sub>N = 95:5:1) gereinigt. Es werden 4.0 g (100 %) der entschützten Verbindung **131** als farbloser Schaum erhalten.

**R<sub>F</sub>-Wert:** 0.53 (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH/EtMe<sub>2</sub>N = 90:10:1)

**<sup>1</sup>H-NMR** (400 MHz, (CD<sub>3</sub>)<sub>2</sub>O, 300 K): δ = 1.142 (d, 24/26-H<sub>3</sub>), 1.17-1.24 (m, 24/26-H<sub>9</sub>), 2.60-2.70 (m, 2'-H, 21-H), 2.769 (t, 21-H'), 2.97-3.08 (m, 2'-H'), 3.31-3.50 (m, 5'-H<sub>2</sub>), 3.56-3.96 (m, 19-H<sub>6</sub>, 20-H<sub>2</sub>, 23-H, 25-H), 4.17-4.27 (m, 4'-H), 4.79-4.89 (m, 3'-H), 6.322 (t, 1'-H), 6.79-6.89 (m, 17-H<sub>4</sub>), 6.955 (br. s, 2-NH<sub>2</sub>), 7.14-7.38, 7.42-7.51 (m, 12-H<sub>2</sub>, 13-H<sub>2</sub>, 14-H, 16-H<sub>4</sub>), 7.895 (s, 8-H) ppm

**<sup>31</sup>P-NMR** (121 MHz, (CD<sub>3</sub>)<sub>2</sub>O, 300 K): δ = 148.087, 148.298 ppm

**ESI(+)-MS (m/z):** ber.: 769.82 [C<sub>40</sub>H<sub>48</sub>N<sub>7</sub>O<sub>7</sub>P]  
gef.: 770.9 [M+H]<sup>+</sup>

7.10.3.6 Herstellung von 1-Hydroxy-6-nitrobenzotriazol ( $\text{HO}^n\text{Bt}$ ) **58**

Entsprechend der Literatur<sup>[347]</sup> werden 15 g 2,4-Dinitrophenylhydrazin **133** (51.5 mmol, 1.0 Äq.) in 100 mL Ethanol suspendiert. 2,4-Dinitrophenylhydrazin **133** ist nur mit 30 % Wasser erhältlich, da es im trockenen Zustand explosiv ist. Zu der Suspension werden 15.3 mL Hydrazin Monohydrat (309 mmol, 6.0 Äq.) gegeben und fünf Stunden auf 80-100 °C erhitzt, bis sich alles gelöst hat und eine dunkelrote Lösung entstanden ist. Zu der abgekühlten Lösung werden dann 50 mL demineralisiertes Wasser geben und die Mischung im Vakuum auf ein Drittel ihres Volumens reduziert. Die restliche Lösung wird mit demineralisiertem Wasser auf 500 ml verdünnt, auf 80 °C erhitzt und dann mit konzentrierter HCl versetzt bis ein pH-Wert von 1 erreicht ist. Dabei fällt ein voluminöser Feststoff aus, der abgesaugt wird und aus Wasser unter Zugabe von etwas Ethanol umkristallisiert wird. Es werden 6.1 g (66 %) der Verbindung **58** als dunkelbrauner Feststoff erhalten.

**$^1\text{H-NMR}$**  (400 MHz,  $\text{DMSO-d}_6$ , 300 K):  $\delta$  = 8.149 (dd, 6-H), 8.201 (d, 5-H), 8.590 (d, 8-H), 13.825 (br. s, 1-OH) ppm;  $J_{5,6}$  = 9.3 Hz,  $J_{6,8}$  = 2.0 Hz

**$^{13}\text{C-NMR}$**  (100 MHz,  $\text{DMSO-d}_6$ , 300 K):  $\delta$  = 107.36, 119.15, 120.63 (5-C, 6-C, 8-C), 126.99, 144.71, 146.28 (4-C, 7-C, 9-C) ppm

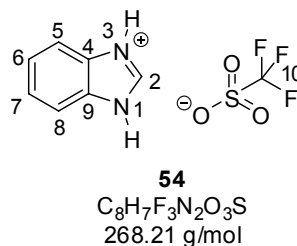
**ESI(+)-MS ( $m/z$ ):**

ber.:	180.12	$[\text{C}_6\text{H}_4\text{N}_4\text{O}_3]$
gef.:	180.6	$[\text{M}+\text{H}]^+$

**EA (%):**

ber.:	C: 40.01	H: 2.24	N: 31.11
gef.:	C: 39.89	H: 2.06	N: 31.38

### 7.10.3.7 Herstellung von Benzimidazolium Triflat (BIT) **54**



Entsprechend der Literatur<sup>[346]</sup> werden 5 g Benzimidazol **132** (41.5 mmol, 1.0 Äq.) in 60 mL Dichlormethan suspendiert und auf 0 °C gekühlt. Zu der gekühlten Suspension werden 3.75 mL Trifluoromethansulfonsäure (41.5 mmol, 1.0 Äq.) gegeben und 30 Minuten bei 0 °C gerührt. Anschließend werden 60 mL Ether zugegeben und weitere zehn Minuten bei 0 °C gerührt. Der Niederschlag wird abfiltriert und im Vakuum getrocknet. Es werden 11.2 g (100 %) der Verbindung **54** als hellbrauner Feststoff erhalten und ohne weiter Aufreinigung verwendet.

<sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>, 300 K):  $\delta$  = 7.54-7.62 (m, 5-H, 8-H), 7.80-7.89 (m, 6-H, 7-H), 9.547 (br. s, 2-H), 14.588 (br. s, 1-NH, 3-NH) ppm

<sup>13</sup>C-NMR (100 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>, 300 K):  $\delta$  = 114.46 (5-C, 8-C), 120.71 (q, 10-C), 126.16 (6-C, 7-C), 130.44 (4-C, 9-C), 140.64 (2-C) ppm;  $J_{10,\text{F}}$  = 322.5 Hz

### 7.10.4 Herstellung der unmodifizierten Sequenz **122**

Es wird zunächst die unmodifizierte Sequenz (5'-G\*C\*A\*T\*T\*G\*G\*βT\*A\*βT\*βT\*C-3' **122**) synthetisiert, um die Methode zu testen, wobei βT für LNA-T steht und die Sternchen Phosphorthioat Bindungen symbolisieren.

An einer fertig gepackten 1 μmol Säule mit *N*-Benzoyl-5'-*O*-(4,4'-dimethoxytrityl)-2'-desoxycytidin-3'-CPG von *Applied Biosystems* wird das Oligomer **122** entsprechend dem beschriebenen Syntheseprotokoll hergestellt (siehe Tabelle 7-11). Zur Abspaltung von der festen Phase und zur Entschützung des 3'-Nukleotids wird das im Vakuum getrocknete CPG-Material mit dem synthetisierten Oligomer **122** in ein 4 mL Greiner-Röhrchen überführt, 2 mL konzentrierte, wässrige Ammoniak-Lösung zugegeben und über Nacht bei 40 °C inkubiert. Anschließend wird die Lösung abfiltriert, der Überstand mit Millipore Wasser gewaschen und die vereinigten Filtrate lyophilisiert. Nach Aufreinigung durch RP-HPLC (Gradient: RP-HPLC5) und anschließendem Entsalzen

erhält man eine Ausbeute von 16 OD<sub>260</sub>, was einer Ausbeute von 14 % entspricht ( $\epsilon = 112.05 \text{ cm}^2 \cdot 1000 \cdot \text{mmol}^{-1}$ ).

**RP-HPLC:** Gradient: RP-HPLC5  
Retentionszeit: 15.67 Min.

**ESI(-)-MS (*m/z*):** ber.: 3912.18  
gef.: 1303.7 [M]<sup>3-</sup>

#### 7.10.4.1 Herstellung der modifizierten Sequenz 141

Die Sequenz des modifizierten Oligomers **141** entspricht der des unmodifizierten. Am 5'-Ende wird dann zusätzlich das Amidit **125** angehängt (5'-T<sub>mod</sub>\*G\*C\*A\*T\*T\*G\*G\*βT\*A\*βT\*βT\*C-3' **141**). T<sub>mod</sub> steht hier für das Linker-modifizierte, *N*-Boc-geschützte Phosphoramidit **125**.

100 mg (ca. 1.4 μmol) des Polystyrol Trägermaterials **123** werden in eine Polystyrol Hülse (ca. 500 μL Leervolumen) gefüllt und von beiden Seiten mit Adapterfritten, die in den Synthesizer passen, verschlossen. Auch das Syntheseprotokoll (siehe Tabelle 7-11) wird an das größere Volumen angepasst. Die Synthese des Oligomers **141** wird entsprechend des beschriebenen Syntheseprotokolls durchgeführt. Anschließend wird für zehn Minuten manuell mit 3 %iger TCA-Lösung gewaschen (Versuch der Entschüttung) und dann mit Acetonitril. Das Polystyrol Material wird im Vakuum getrocknet. Zum Abspalten der 2-Cyanoethyl Gruppe am Phosphat-Rückgrad wird zwei Minuten lang mit 10 %iger DBU-Lösung in Acetonitril behandelt. Die Abspaltung vom Träger erfolgt dann mit 0.2 M Et<sub>3</sub>N·3HF in trockenem THF für vier Stunden bei Raumtemperatur. Die Lösung wird anschließend abfiltriert und die zurückbleibende feste Phase erst mit 3 mL THF und dann mit 3 mL Acetonitril gewaschen. Das Oligonukleotid **141** wird dann mit 3.0 mL Millipore Wasser vom PS-Material eluiert. Die wässrige Phase wird in der Speed-Vac eingeeengt und der Rückstand mittels RP-HPLC (Gradient: RP-HPLC5) und Entsalzung gereinigt und durch MALDI-MS analysiert. Es wurden 32 OD<sub>260</sub> des Boc-geschützten Oligonukleotids **141** erhalten. Das entspricht einer Ausbeute von 23 % ( $\epsilon = 128.30 \text{ cm}^2 \cdot 1000 \cdot \text{mmol}^{-1}$ ).

**MALDI(-)-MS (*m/z*):** ber.: 4626.83  
gef.: 4639.47

### 7.10.5 5'→3' Oligonukleotidsynthese

Um das Phosphoramidit **170** in der Oligonukleotidsynthese einsetzen zu können muss in die inverse Richtung (5'→3' anstatt 3'→5') synthetisiert werden. Die entsprechenden 5'-Phosphoramidite und das mit dem ersten Nukleotid beladene Trägermaterial (3'-O-(4,4'-Dimethoxytrityl)-2'-desoxythymidin-5'-CPG, 500 Å, 1 µmol) wurden von Glen Research bezogen.

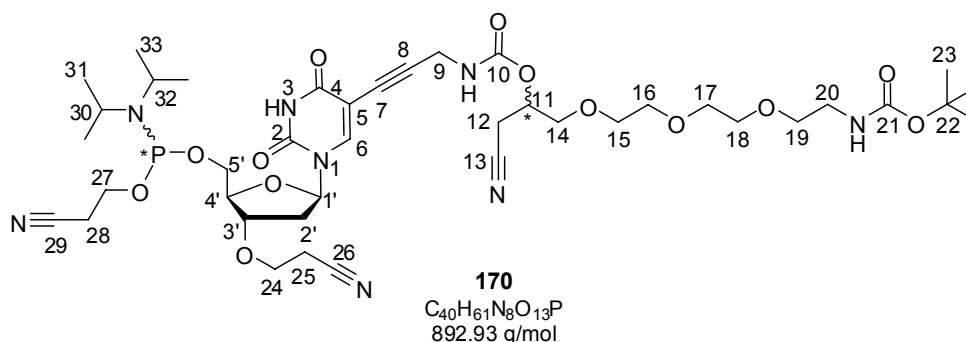
Das Syntheseprotokoll für die Oligonukleotid Synthese im 1 µmol Maßstab entsprach dem Standardprotokoll des verwendeten Synthesizers.

Es wurden die folgenden Lösungen zur Oligonukleotid Synthese hergestellt bzw. verwendet:

- 0.1 M Lösungen der vier 5'-Phosphoramidite sowie des modifizierten Phosphoramidits **170** in trockenem Acetonitril
- Aktivator (0.45 M Tetrazol in ACN, Proligo Biochemie)
- Oxidizer (4.3 g/L I<sub>2</sub> in THF/Pyridin/H<sub>2</sub>O = 7:1:2, Biosolve)
- 3 %ige TCA-Lösung in trockenem Dichlormethan (Deblock-Lösung, Perseptive Biosystems)
- Capping Reagenzien (Cap A (THF/Acetanhydrid), Cap B (THF/1-Methylimidazol/Pyridin), Proligo Biochemie)

Die folgende Sequenz wurde für die Spaltungstests synthetisiert: 5'-TATGACCT<sub>mod</sub>-3' wobei T<sub>mod</sub> für den modifizierten Baustein **170** steht.

### 7.10.5.1 Herstellung von 5-(Prop-2-ynyl)carbaminsäure-1-{2-[2-(2-aminoethoxy)ethoxymethyl]-2-cyanoethylester-3'-O-(2-cyanoethyl)2'-desoxyuridin 5'-Phosphoramidit **170**



Unter inerten Bedingungen werden 200 mg, des über zwei Tage im Vakuum getrockneten, Nukleosids **169** (0.29 mmol, 1.0 Äq.) in 5 mL trockenem Dichlormethan gelöst. Es werden 138 µL *N,N,N,N*-Tetraisopropyl-*O*-cyanoethyl-phosphoramidit **124** (0.44 mmol, 1.5 Äq.) und 40 mg 4,5-Dicyanoimidazol (0.33 mmol, 1.15 Äq.) zugegeben und die Reaktionslösung vier Stunden bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend wird die Reaktionslösung mit Dichlormethan auf ein Volumen von insgesamt 25 mL verdünnt und in einen Schütteltrichter auf 25 mL gesättigte NaHCO<sub>3</sub>-Lösung gegossen. Die Phasen werden nur zwei bis dreimal vorsichtig gemischt und dann sofort getrennt. Die organische Phase wird ebenfalls sehr zügig mit 25 mL gesättigter NaCl-Lösung gewaschen und sofort fünf Minuten lang über Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> getrocknet, wobei die Mischung nicht gerührt, sondern nur vorsichtig geschwenkt wird. Die Lösung wird abfiltriert und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Das Rohprodukt wird über eine kurze Säule durch Flash-Säulenchromatographie gereinigt (erst CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/EtOAc/EtMe<sub>2</sub>N = 8:2:0.2 dann CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH/EtMe<sub>2</sub>N = 98:2:0.02) und es werden 260 mg (100 %) des Phosphoramidits **170** als leicht gelblicher Schaum erhalten.

**R<sub>F</sub>-Wert:** 0.17 (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH/EtMe<sub>2</sub>N = 9:1:0.1)

Im NMR können zwei Stereoisomere im Verhältnis 1:1 beobachtet werden, die mit a und b gekennzeichnet sind.

**<sup>1</sup>H-NMR** (400 MHz, Acetone-d<sub>6</sub>, 300 K): δ = 1.24-1.31 (m, 31a-H<sub>6</sub>, 31b-H<sub>6</sub>, 33a-H<sub>6</sub>, 33b-H<sub>6</sub>), 1.448 (s, 23a-H<sub>9</sub>, 23b-H<sub>9</sub>), 2.26-2.41 (m, 2'a-H, 2'b-H), 2.47-2.57 (m, 2'a-H', 2'b-H'), 2.817 (t, 25a-H<sub>2</sub>, 25b-H<sub>2</sub>), 2.85-2.99 (m, 12a-H<sub>2</sub>, 12b-H<sub>2</sub>, 28a-H<sub>2</sub>, 28b-H<sub>2</sub>), 3.266 (q, 20a-H<sub>2</sub>, 20b-H<sub>2</sub>), 3.544 („t“, 19a-H<sub>2</sub>, 19b-H<sub>2</sub>), 3.61-3.80 (m, 14a-H<sub>2</sub>, 14b-H<sub>2</sub>, 15a-H<sub>2</sub>, 15b-H<sub>2</sub>, 16a-H<sub>2</sub>, 16b-H<sub>2</sub>, 17a-H<sub>2</sub>, 17b-H<sub>2</sub>, 18a-H<sub>2</sub>, 18b-H<sub>2</sub>, 30a-H, 30b-H, 32a-

H, 32b-H), 3.82-3.88 (m, 24a-H<sub>2</sub>, 24b-H<sub>2</sub>), 3.91-4.05 (m, 5'a-H<sub>2</sub>, 5'b-H<sub>2</sub>, 27a-H<sub>2</sub>, 27b-H<sub>2</sub>), 4.17-4.24 (m, 9a-H<sub>2</sub>, 9b-H<sub>2</sub>), 4.285/4.313 („q“, 4'a-H, 4'b-H), 4.34-4.38/4.39-4.43 (m, 3'a-H, 3'b-H), 5.091 (Quintett, 11a-H, 11b-H), 5.915 (br. s, 20-NH), 6.242/6.295 (dd, 1'a-H, 1'b-H), 7.044 (m, 9-NH), 8.043/8.128 (s, 6a-H, 6b-H), 10.237 (br. s, N<sup>3</sup>aH, N<sup>3</sup>bH) ppm;  $J_{19,20} = 5.8$  Hz

<sup>13</sup>C-NMR (100 MHz, Acetone-d<sub>6</sub>, 300 K):  $\delta = 19.18/19.20$  (25a-C, 25b-C), 20.54 (12a-C, 12b-C), 20.84/20.87 (d, 28a-C, 28b-C), 24.9-25.1 (m, 31a-C, 31b-C, 33a-C, 33b-C), 28.65 (23a-C, 23b-C), 31.87/31.93 (9a-C, 9b-C), 38.32/38.47 (2'a-C, 2'b-C), 41.05 (20a-C, 20b-C), 43.86 (d, 30a-C, 30b-C, 32a-C, 32b-C), 59.63/59.77 (d, 27a-C, 27b-C), 64.03/64.81 (d, 5'a-C, 5'b-C), 64.99/65.04 (24a-C, 24b-C), 69.30 (11a-C, 11b-C), 70.63 (19a-C, 19b-C), 70.91, 71.07, 71.18, 71.31, 71.65 (14a-C, 14b-C, 15a-C, 15b-C, 16a-C, 16b-C, 17a-C, 17b-C, 18a-C, 18b-C), 75.36/75.40 (7a-C, 7b-C), 78.65 (22a-C, 22b-C), 80.91/81.20 (3'a-C, 3'b-C), 85.09/85.11 (d, 4'a-C, 4'b-C), 86.18/86.50 (1'a-C, 1'b-C), 90.06/90.20 (5a-C, 5b-C), 99.81/99.92 (8a-C, 8b-C), 117.72 (13a-C, 13b-C), 118.96/118.97 (26a-C, 26b-C), 119.15/119.16 (28a-C, 28b-C), 143.74/143.94 (6a-C, 6b-C), 150.22/150.29 (2a-C, 2b-C), 155.85/155.88 (10a-C, 10b-C), 156.62 (21a-C, 21b-C), 162.02 (4a-C, 4b-C) ppm;  $J_{P,4'a,b} = 8.4$  Hz,  $J_{P,5'a,b} = 15.4$  Hz,  $J_{P,27a,b} = 19.9$  Hz,  $J_{P,28a,b} = 7.1$  Hz,  $J_{P,30a,b/32a,b} = 12.4$  Hz

<sup>31</sup>P-NMR (121 MHz, D<sub>2</sub>O, 300 K):  $\delta = 148.23, 148.43$  (s, Isomer a-P, Isomer b-P) ppm

ESI(+)-MS (*m/z*): ber.: 892.93 [C<sub>40</sub>H<sub>61</sub>N<sub>8</sub>O<sub>13</sub>P]  
gef.: 910.9 [M+NH<sub>4</sub>]<sup>+</sup>, 915.8 [M+Na]<sup>+</sup>, 893.8 [M+H]<sup>+</sup>

#### 7.10.5.2 Herstellung des CPG-gebundenen, Fluorescein markierten Oligonukleotids 173

An einer fertig gepackten Säule mit 3'-O-(4,4'-Dimethoxytrityl)-2'-desoxythymidin-5'-CPG Material (500 Å, 1 µmol) wird das Oligomer entsprechend dem Standardsyntheseprotokoll zunächst bis zum Einbau des modifizierten Bausteins **170** synthetisiert. Das Amidit **170** wird dann in einem separaten Kupplungsschritt eingebaut. Die Kupplungsausbeuten betrugen in allen Schritten mehr als 98 % (DMTr-Protokoll). Um die Kupplung des Farbstoffs zu ermöglichen wird nach beendeter Synthese zunächst am Synthesizer 20mal mit der Deblock-Lösung (3 %ige TCA Lösung in Dichlormethan) behandelt und dann mit Acetonitril gewaschen, um die Boc-Schutzgruppe zu entfernen. Zur Kupplung des als *N*-Hydroxysuccinimidylester aktivierten Farbstoffs wird das kurzzeitig im Vakuum getrocknete CPG-Material in eine leere ExtractClean<sup>TM</sup> Säule mit Polyethylen Fritte und Hahn der Firma Grace überführt. Zu dem CPG-Material werden 10 Äq. Fluoresceine-*N*-hydroxysuccinimidylester (5 mg, 10 µmol) und 15 Äq. *N*-Ethyl-diisopropylamin (2.6 µL, 15 µmol) in 400 µL trockenem DMF gegeben. Die Säule wird mit einem passenden Inlet Cap verschlossen und 20

Stunden im Schüttelinkubator bei Raumtemperatur geschüttelt. Nach 20 Stunden wird die Lösung durch den Hahn abgelassen und die feste Phase gründlich mit DMF, Dichlormethan, Methanol und Diethylether gewaschen und im Vakuum getrocknet.

#### **7.10.5.3 Entschützung am Trägermaterial mit 1 M TBAF und Isolierung des entschützten Oligonukleotids 175**

Das CPG-Material mit dem Oligonukleotid **173** wird in einer ExtractClean™ Säule mit Polyethylen Fritte und Hahn der Firma Grace in 6 mL trockenem DMF suspendiert und mit 6 mL 1 M TBAF in THF versetzt. Im Schüttelinkubator wird 15 Minuten bei 45 °C geschüttelt. Dann wird die Lösung durch den Hahn abgelassen und die Fluoreszenz qualitativ unter einer UV-Lampe bei 366 nm untersucht. Die feste Phase mit dem entschützten Oligomer wird gründlich mit Dichlormethan und Methanol gewaschen und im Vakuum getrocknet. Das getrocknete CPG-Material wird dann in ein 4 mL Greiner-Röhrchen überführt und mit 2 mL 25 %igem, wässrigem Ammoniak versetzt und 18 Stunden bei 40 °C inkubiert. Die feste Phase wird abfiltriert und mit demineralisiertem Wasser gewaschen. Die vereinigten Filtrate werden lyophilisiert und anschließend mittels IA-HPLC (Gradient IA-HPLC1) gereinigt. Nach dem Entsalzen wird das Oligonukleotid **175** durch MALDI-MS analysiert. Man erhält 6 OD<sub>260</sub>, was einer Ausbeute von etwa 9 % entspricht ( $\epsilon = 67.23 \text{ cm}^2 \cdot 1000 \cdot \text{mmol}^{-1}$ ).

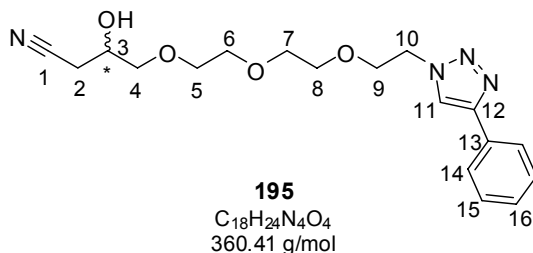
**IA-HPLC:** Gradient: IA-FPLC1  
Retentionszeit: 16.36 Min.

**MALDI(-)-MS (*m/z*):** ber.: 2423.63  
gef.: 2429.62 [M]<sup>-</sup>



## 7.11 „Click“-Reaktionen an dem Fluorid-spaltbaren Linker **143**

### 7.11.1 Herstellung von 3-Hydroxy-4-(2-{2-[2-(4-phenyl-1,2,3-triazol-1-yl)ethoxy]ethoxy}ethoxy)butyronitril **195**



500 mg des Linkers **143** (1.94 mmol, 1.0 Äq.) werden in 5 mL Methanol und 10 mL Dichlormethan gelöst. Zu der Lösung werden 31 mg CuSO<sub>4</sub> (0.19 mmol, 0.1 Äq.), 775 mg Natriumascorbat (3.87 mmol, 2.0 Äq.) und 329 mg Phenylacetylen (2.90 mmol, 1.5 Äq.) gegeben und die Reaktionsmischung bei Raumtemperatur gerührt. Nach 18 Stunden werden weitere 110 mg Phenylacetylen (0.97 mmol, 0.5 Äq.) zugegeben und noch mal 24 Stunden bei Raumtemperatur gerührt. Das Lösungsmittel wird anschließend im Vakuum entfernt und der Rückstand in 50 mL Dichlormethan aufgenommen. Die organische Phase wird zweimal mit je 25 mL 5 %iger EDTA-Lösung gewaschen, über Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> getrocknet und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Das Rohprodukt wird mittels Flash-Säulenchromatographie gereinigt (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH = 98:2 bis CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH = 95:5) und 670 mg (96 %) eines farblosen Öls als Produkt **195** erhalten.

**R<sub>F</sub>-Wert:** 0.40 (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH = 90:10)

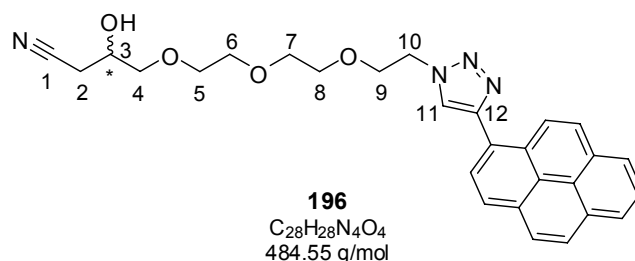
**<sup>1</sup>H-NMR** (400 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>, 300 K): δ = 2.498 (dd, 2-H), 2.619 (dd, 2-H'), 3.271 (dd, 4-H), 3.371 (dd, 4-H'), 3.46-3.58 (m, 5-H<sub>2</sub>, 6-H<sub>2</sub>, 7-H<sub>2</sub>, 8-H<sub>2</sub>), 3.79-3.90 (m, 3-H, 9-H<sub>2</sub>), 4.571 (t, 10-H<sub>2</sub>), 5.449 (d, 3-OH), 7.30-7.36 (m, 16-H), 7.42-7.49 (m, 15-H<sub>2</sub>), 7.81-7.87 (m, 14-H<sub>2</sub>), 8.522 (s, 11-H) ppm; *J*<sub>2,2'</sub> = 16.9 Hz, *J*<sub>4,4'</sub> = 9.8 Hz

**<sup>13</sup>C-NMR** (100 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>, 300 K): δ = 22.47 (2-C), 49.58 (10-C), 65.19 (3-C), 68.64 (9-C), 69.61, 70.07 (5-C, 6-C, 7-C, 8-C), 73.33 (4-C), 118.79 (1-C), 121.71 (11-C), 125.07 (14-C), 127.76 (16-C), 128.86 (15-C) 130.82 (13-C), 146.16 (12-C) ppm

**ESI(+)-MS (*m/z*):** ber.: 360.41 [C<sub>18</sub>H<sub>24</sub>N<sub>4</sub>O<sub>4</sub>]  
gef.: 361.3 [M+H]<sup>+</sup>

EA (%):	ber.:	C: 59.99	H: 6.71	N: 15.55
	gef.:	C: 59.89	H: 6.68	N: 15.28

### 7.11.2 Herstellung von 3-Hydroxy-4-(2-{2-[2-(4-pyren-1-yl-1,2,3-triazol-1-yl)ethoxy]ethoxy}ethoxy)butyronitril **196**



#### Variante A:

110 mg des Linkers **143** (0.43 mmol, 1.0 Äq.) werden in 2 mL Dichlormethan und 1 mL Methanol gelöst. Zu der Lösung werden 7 mg CuSO<sub>4</sub> (0.04 mmol, 0.1 Äq.) und 170 mg Natriumascorbat (0.85 mmol, 2.0 Äq.) zugegeben. In einem separaten Kolben werden 146 mg 1-Ethynylpyren (0.64 mmol, 1.5 Äq.) in 4 mL Dichlormethan und 2 mL Methanol gelöst und mit Hilfe einer Spritze zu der Lösung des Linkers zugetropft. Es wird 20 Stunden bei Raumtemperatur gerührt. Die DC Kontrolle zeigt eine langsame Reaktion, daher wird die Reaktionsmischung für 24 Stunden auf 40 °C erhitzt. Anschließend wird das Lösungsmittel im Vakuum entfernt und der Rückstand in 20 mL Dichlormethan aufgenommen. Die organische Phase wird zweimal mit je 10 mL 5 %iger EDTA-Lösung gewaschen, über Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> getrocknet und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Das Rohprodukt wird mittels Flash-Säulenchromatographie gereinigt (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH = 99:1 bis CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH = 98:2) und 85 mg (41 %) eines gelben Öls werden als Produkt **196** erhalten.

#### Variante B:

100 mg des Linkers **143** (0.38 mmol, 1.0 Äq.), 0.13 mL *N*-Ethyl-diisopropylamin (0.77 mmol, 2.0 Äq.) und Kupfer(I)iodid (7.2 mg, 0.038 mmol, 0.1 Äq.) werden vermischt und für 30 Minuten bei 250 W in der Labormikrowelle bestrahlt. Anschließend wird der Rückstand in Dichlormethan aufgenommen und zweimal mit 10 mL 5 %iger EDTA-Lösung gewaschen. Die organische Phase wird über Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> getrocknet, filtriert und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Das Rohprodukt wird mittels Flash-Säulenchromatographie gereinigt (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH = 99:1 to

CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH = 98:2) und man erhält 110 mg (60 %) der Verbindung **196** als gelbes Öl.

**R<sub>F</sub>-Wert:** 0.22 (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH = 95:5)

**<sup>1</sup>H-NMR** (400 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>, 300 K): δ = 2.459 (dd, 2-H), 2.575 (dd, 2-H'), 3.226 (dd, 4-H), 3.30-3.35 (m, 4-H'), 3.45-3.66 (m, 5-CH<sub>2</sub>, 6-CH<sub>2</sub>, 7-CH<sub>2</sub>, 8-CH<sub>2</sub>), 3.807 („Sextett“, 3-H), 3.992 (t, 9-H<sub>2</sub>), 4.728 (t, 10-H<sub>2</sub>), 5.437 (d, 3-OH), 8.115 (t, Pyren-H), 8.20-8.45 (m, Pyren-H<sub>7</sub>), 8.742 (s, 11-H), 8.884 (d, Pyren-H) ppm; *J*<sub>2,2'</sub> = 16.8 Hz, *J*<sub>9,10</sub> = 5.0 Hz

**<sup>13</sup>C-NMR** (100 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>, 300 K): δ = 22.43 (2-C), 49.67 (10-C), 65.17 (3-C), 68.68 (9-C), 69.63, 69.64, 69.68, 70.06 (5-C, 6-C, 7-C, 8-C), 73.32 (4-C), 118.77 (1-C), 124.83, 124.87 (11-C, Pyren-C), 125.12, 125.15, 125.52, 126.46, 126.98, 127.33, 127.64, 127.96 (8×Pyren-C), 123.93, 1242.31, 125.46, 127.46, 130.36, 130.52, 130.94, 145.98 (12-C, 7×quartäres Pyren-C) ppm

**HR-ESI(-)-MS (*m/z*):** ber.: 483.2038 [C<sub>28</sub>H<sub>27</sub>N<sub>4</sub>O<sub>4</sub>]<sup>-</sup>  
gef.: 483.2043 [M-1]<sup>-</sup>

**Fluoreszenz:** Anregung 352 nm, Emission 390 nm, 408 nm



## 8 Literatur

- [1] Watson, J. D.; Crick, F. H. C. "Molecular structure of nucleic acids - A structure for deoxyribose nucleic acid" *Nature* **1953**, *171*, 737-738.
- [2] Sanger, F.; Thompson, E. O. P. "The amino-acid sequence in the glycyl chain of Insulin. 1. The identification of lower peptides from partial hydrolysates" *Biochem. J.* **1953**, *53*, 353-366.
- [3] Sanger, F.; Thompson, E. O. P. "The amino-acid sequence in the glycyl chain of Insulin. 2. The investigation of peptides from enzymic hydrolysates" *Biochem. J.* **1953**, *53*, 366-374.
- [4] Jacob, F.; Monod, J. "Genetic regulatory mechanisms in synthesis of proteins" *J. Mol. Biol.* **1961**, *3*, 318-356.
- [5] Nirenberg, M. W.; Martin, R. G.; Jones, O. W.; Barondes, S. H.; Mathhaei, J. H. "Approximation of genetic code via cell-free protein synthesis directed by template RNA" *Fed. Proc.* **1963**, *22*, 55-61.
- [6] Ochoa, S. "Synthetic polynucleotides and genetic code" *Fed. Proc.* **1963**, *22*, 62-74.
- [7] Khorana, H. G. "Polynucleotide synthesis and genetic code" *Fed. Proc.* **1965**, *24*, 1473-1487.
- [8] Crick, F. "Central dogma of molecular biology" *Nature* **1970**, *227*, 561-563.
- [9] Beaucage, S. L.; Caruthers, M. H. "Deoxynucleoside phosphoramidites - A new class of key intermediates for deoxypolynucleotide synthesis" *Tetrahedron Lett.* **1981**, *22*, 1859-1862.
- [10] Sinha, N. D.; Biernat, J.; Koster, H. " $\beta$ -Cyanoethyl *N,N*-Dialkylamino/*N*-Morpholinomono-chloro phosphoamidites, new phosphitylating agents facilitating ease of deprotection and work-up of synthesized oligonucleotides" *Tetrahedron Lett.* **1983**, *24*, 5843-5846.
- [11] Caruthers, M. H.; Barone, A. D.; Beaucage, S. L., *et al.* "Chemical synthesis of deoxyoligonucleotides by the phosphoramidite method" *Methods Enzymol.* **1987**, *154*, 287-313.
- [12] Engels, J. W. "Krankheit - Fehler in der Informationsübertragung" *Nachr. Chem. Tech. Lab.* **1991**, *39*, 1250-1254.
- [13] Zamecnik, P. C.; Stephenson, M. L. "Inhibition of Rous-Sarcoma Virus-replication and cell transformation by a specific oligodeoxynucleotide" *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1978**, *75*, 280-284.
- [14] Bennett, C. F.; Cowsert, L. M. "Antisense oligonucleotides as a tool for gene functionalization and target validation" *Biochim. Biophys. Acta, Gene Struct. Expression* **1999**, *1489*, 19-30.
- [15] Kurreck, J. "Antisense technologies - Improvement through novel chemical modifications" *Eur. J. Biochem.* **2003**, *270*, 1628-1644.
- [16] The Vitrevec Study Group "A randomized controlled clinical trial of intravitreal Fomivirsen for treatment of newly diagnosed peripheral cytomegalovirus retinitis in patients with AIDS" *Am. J. Ophthalmol.* **2002**, *133*, 467-474.
- [17] Malik, R.; Roy, I. "Design and development of antisense drugs" *Expert Opin. Drug Discovery* **2008**, *3*, 1189-1207.

- [18] Yu, R. Z.; Geary, R. S.; Flaim, J. D.; Riley, G. C.; Tribble, D. L.; Vanvliet, A. A.; Wedel, M. K. "Lack of pharmacokinetic interaction of Mipomersen Sodium (ISIS 301012), a 2'-O-methoxyethyl modified antisense oligonucleotide targeting apolipoprotein B-100 messenger RNA, with Simvastatin and Ezetimibe" *Clin. Pharmacokinet.* **2009**, *48*, 39-50.
- [19] Miner, P. B.; Wedel, M. K.; Xia, S.; Baker, B. F. "Safety and efficacy of two dose formulations of alicaforsen enema compared with mesalazine enema for treatment of mild to moderate left-sided ulcerative colitis: a randomized, double-blind, active-controlled trial" *Alimentary Pharmacology & Therapeutics* **2006**, *23*, 1403-1413.
- [20] Paz-Ares, L.; Douillard, J. Y.; Koralewski, P., *et al.* "Phase III study of Gemcitabine and Cisplatin with or without Aprinocarsen, a protein kinase C alpha antisense oligonucleotide, in patients with advanced-stage non-small-cell lung cancer" *J. Clin. Oncol.* **2006**, *24*, 1428-1434.
- [21] Yakubov, L. A.; Deeva, E. A.; Zarytova, V. F.; Ivanova, E. M.; RYTE, A. S.; Yurchenko, L. V.; Vlassov, V. V. "Mechanism of oligonucleotide uptake by cells - Involvement of specific receptors" *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1989**, *86*, 6454-6458.
- [22] Vlassov, V. V.; Balakireva, L. A.; Yakubov, L. A. "Transport of oligonucleotides across natural and model membranes" *Biochim. Biophys. Acta, Rev. Biomembr.* **1994**, *1197*, 95-108.
- [23] Loke, S. L.; Stein, C. A.; Zhang, X. H., *et al.* "Characterization of oligonucleotide transport into living cells" *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1989**, *86*, 3474-3478.
- [24] Juliano, R.; Alam, M. R.; Dixit, V.; Kang, H. "Mechanisms and strategies for effective delivery of antisense and siRNA oligonucleotides" *Nucleic Acids Res.* **2008**, *36*, 4158-4171.
- [25] Yu, B.; Zhao, X. B.; Lee, L. J.; Lee, R. J. "Targeted delivery systems for oligonucleotide therapeutics" *AAPS J.* **2009**, *11*, 195-203.
- [26] Petzinger, E.; Wickboldt, A.; Pagels, P.; Starke, D.; Kramer, W. "Hepatobiliary transport of bile acid amino acid, bile acid peptide, and bile acid oligonucleotide conjugates in rats" *Hepatology* **1999**, *30*, 1257-1268.
- [27] Starke, D.; Lischka, K.; Pagels, P.; Uhlmann, E.; Kramer, W.; Wess, G.; Petzinger, E. "Bile acid-oligodeoxynucleotide conjugates: Synthesis and liver excretion in rats" *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2001**, *11*, 945-949.
- [28] Lischka, K.; Starke, D.; Failing, K.; Herling, A.; Kramer, W.; Petzinger, E. "Hepatobiliary elimination of bile acid-modified oligodeoxynucleotides in Wistar and TR- rats: Evidence for mrp2 as carrier for oligodeoxynucleotides" *Biochem. Pharmacol.* **2003**, *66*, 565-577.
- [29] Zhao, X. B.; Lee, R. J. "Tumor-selective targeted delivery of genes and antisense oligodeoxyribonucleotides via the folate receptor" *Adv. Drug Delivery Rev.* **2004**, *56*, 1193-1204.
- [30] Alam, M. R.; Dixit, V.; Kang, H. M., *et al.* "Intracellular delivery of an anionic antisense oligonucleotide via receptor-mediated endocytosis" *Nucleic Acids Res.* **2008**, *36*, 2764-2776.
- [31] Moulton, H. M.; Nelson, M. H.; Hatlevig, S. A.; Reddy, M. T.; Iversen, P. L. "Cellular uptake of antisense morpholino oligomers conjugated to arginine-rich peptides" *Bioconjugate Chem.* **2004**, *15*, 290-299.

- [32] Maxam, A. M.; Gilbert, W. "A new method for sequencing DNA" *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1977**, *74*, 560-564.
- [33] Sanger, F.; Nicklen, S.; Coulson, A. R. "DNA sequencing with chain-terminating inhibitors" *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1977**, *74*, 5463-5467.
- [34] Dunn, J. J.; Studier, F. W. "Complete nucleotide-sequence of Bacteriophage-T7 DNA and the locations of T7 genetic elements" *J. Mol. Biol.* **1983**, *166*, 477-535.
- [35] Sanger, F.; Air, G. M.; Barrell, B. G., *et al.* "Nucleotide-sequence of Bacteriophage  $\Phi$ 174 DNA" *Nature* **1977**, *265*, 687-695.
- [36] Prober, J. M.; Trainor, G. L.; Dam, R. J., *et al.* "A system for rapid DNA sequencing with fluorescent chain-terminating dideoxynucleotides" *Science* **1987**, *238*, 336-341.
- [37] Hunkapiller, T.; Kaiser, R. J.; Koop, B. F.; Hood, L. "Large-scale and automated DNA-sequence determination" *Science* **1991**, *254*, 59-67.
- [38] Koutny, L.; Schmalzing, D.; Salas-Solano, O., *et al.* "Eight hundred-base sequencing in a microfabricated electrophoretic device" *Anal. Chem.* **2000**, *72*, 3388-3391.
- [39] Emrich Charles, A.; Tian, H.; Medintz Igor, L.; Mathies Richard, A. "Microfabricated 384-lane capillary array electrophoresis bioanalyzer for ultrahigh-throughput genetic analysis" *Anal. Chem.* **2002**, *74*, 5076-83.
- [40] Doherty, E. A. S.; Kan, C. W.; Barron, A. E. "Sparsely cross-linked "nanogels" for microchannel DNA sequencing" *Electrophoresis* **2003**, *24*, 4170-4180.
- [41] Kan, C. W.; Fredlake, C. P.; Doherty, E. A. S.; Barron, A. E. "DNA sequencing and genotyping in miniaturized electrophoresis systems" *Electrophoresis* **2004**, *25*, 3564-3588.
- [42] Lander, E. S.; Linton, L. M.; Birren, B., *et al.* "Initial sequencing and analysis of the human genome" *Nature* **2001**, *409*, 860-921.
- [43] Venter, J. C.; Adams, M. D.; Myers, E. W., *et al.* "The sequence of the human genome" *Science* **2001**, *291*, 1304-1351.
- [44] Collins, F. S.; Morgan, M.; Patrinos, A. "The Human Genome Project: Lessons from large-scale biology" *Science* **2003**, *300*, 286-290.
- [45] Collins, F. S.; Green, E. D.; Guttmacher, A. E.; Guyer, M. S. "A vision for the future of genomics research" *Nature* **2003**, *422*, 835-847.
- [46] Kahvejian, A.; Quackenbush, J.; Thompson, J. F. "What would you do if you could sequence everything?" *Nat. Biotechnol.* **2008**, *26*, 1125-1133.
- [47] Mardis, E. R. "The impact of next-generation sequencing technology on genetics" *Trends Genet.* **2008**, *24*, 133-141.
- [48] Gibbs, R. A.; Belmont, J. W.; Boudreau, A., *et al.* "A haplotype map of the human genome" *Nature* **2005**, *437*, 1299-1320.
- [49] Service, R. F. "Gene sequencing - The race for the \$1000 Genome" *Science* **2006**, *311*, 1544-1546.
- [50] Schloss, J. A. "How to get genomes at one ten-thousandth the cost" *Nat. Biotechnol.* **2008**, *26*, 1113-1115.
- [51] Ashley, E. A.; Butte, A. J.; Wheeler, M. T., *et al.* "Clinical assessment incorporating a personal genome" *Lancet* **2010**, *375*, 1525-1535.
- [52] Ormond, K. E.; Wheeler, M. T.; Hudgins, L., *et al.* "Challenges in the clinical application of whole-genome sequencing" *Lancet* **2010**, *375*, 1749-1751.

- [53] Maclean, D.; Baldwin, J. J.; Ivanov, V. T.; Kato, Y.; Shaw, A.; Schneider, P.; Gordon, E. M. "Glossary of terms used in combinatorial chemistry - (Technical Report)" *Pure Appl. Chem.* **1999**, *71*, 2349-2365.
- [54] Knepper, K.; Gil, C.; Braese, S. "Linkers for solid-phase synthesis" *Highlights in Bioorganic Chemistry*. Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA: Weinheim, **2004**, 449-484.
- [55] Merrifield, R. B. "Solid phase peptide synthesis.1. Synthesis of a tetrapeptide" *J. Am. Chem. Soc.* **1963**, *85*, 2149-2154.
- [56] Letsinger, R. L.; Mahadeva, V. "Oligonucleotide Synthesis On A Polymer Support" *J. Am. Chem. Soc.* **1965**, *87*, 3526-&.
- [57] Letsinger, R. L.; Lunsford, W. B. "Synthesis of thymidine oligonucleotides by phosphite triester intermediates" *J. Am. Chem. Soc.* **1976**, *98*, 3655-3661.
- [58] Gordon, K.; Balasubramanian, S. "Solid phase synthesis - designer linkers for combinatorial chemistry: a review" *J. Chem. Technol. Biotechnol.* **1999**, *74*, 835-851.
- [59] Patek, M.; Lebl, M. "Safety-catch and multiply cleavable linkers in solid-phase synthesis" *Biopolymers* **1999**, *47*, 353-363.
- [60] Guillier, F.; Orain, D.; Bradley, M. "Linkers and cleavage strategies in solid-phase organic synthesis and combinatorial chemistry" *Chem. Rev. (Washington, DC, U. S.)* **2000**, *100*, 2091-2157.
- [61] Reents, R.; Jeyaraj, D. A.; Waldmann, H. "Enzymatically cleavable linker groups in polymer-supported synthesis" *Drug Discovery Today* **2002**, *7*, 71-76.
- [62] Scott, P. J. H.; Steel, P. G. "Diversity linker units for solid-phase organic synthesis" *Eur. J. Org. Chem.* **2006**, 2251-2268.
- [63] Li, P.; Kolaczowski, E. K.; Kates, S. A. "Linkers and resins for solid-phase synthesis" *Drug Discovery Strategies Methods*. Marcel Dekker Inc.: New York, **2004**, 175-219.
- [64] Wojczewski, C.; Stolze, K.; Engels, J. W. "Fluorescent oligonucleotides - Versatile tools as probes and primers for DNA and RNA analysis" *Synlett* **1999**, 1667-1678.
- [65] Kricka, L. J.; Fortina, P. "Analytical ancestry: "Firsts" in fluorescent labeling of nucleosides, nucleotides, and nucleic acids" *Clin. Chem.* **2009**, *55*, 670-683.
- [66] Zein, N.; Sinha, A. M.; McGahren, W. J.; Ellestad, G. A. "Calicheamicin-Gamma-1-I - An antitumor antibiotic that cleaves double-stranded DNA site specifically" *Science* **1988**, *240*, 1198-1201.
- [67] Auzenne, E.; Donato, N. J.; Li, C.; Leroux, E.; Price, R. E.; Farquhar, D.; Klostergaard, J. "Superior therapeutic profile of poly-L-glutamic acid-paclitaxel copolymer compared with Taxol in xenogeneic compartmental models of human ovarian carcinoma" *Clin. Cancer Res.* **2002**, *8*, 573-581.
- [68] Hamann, P. R.; Hinman, L. M.; Hollander, I., *et al.* "Gemtuzumab Ozogamicin, a potent and selective anti-CD33 antibody-Calicheamicin conjugate for treatment of acute myeloid leukemia" *Bioconjugate Chem.* **2002**, *13*, 47-58.
- [69] Vlahov, I. R.; Santhapuram, H. K. R.; Kleindl, P. J.; Howard, S. J.; Stanford, K. M.; Leamon, C. P. "Design and regioselective synthesis of a new generation of targeted chemotherapeutics. Part 1: EC145, a folic acid conjugate of Desacetylvinblastine Monohydrazide" *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2006**, *16*, 5093-5096.



- [70] Shaffer, S. A.; Baker-Lee, C.; Kennedy, J.; Lai, M. S.; de Vries, P.; Buhler, K.; Singer, J. W. "In vitro and in vivo metabolism of Paclitaxel Poliglumex: Identification of metabolites and active proteases" *Cancer Chemother. Pharmacol.* **2007**, *59*, 537-548.
- [71] Kratz, F.; Muller, I. A.; Ryppa, C.; Warnecke, A. "Prodrug strategies in anticancer chemotherapy" *ChemMedChem* **2008**, *3*, 20-53.
- [72] Plunkett, M. J.; Ellman, J. A. "Germanium and silicon linking strategies for traceless solid-phase synthesis" *J. Org. Chem.* **1997**, *62*, 2885-2893.
- [73] Chenera, B.; Finkelstein, J. A.; Veber, D. F. "Protodetachable arylsilane polymer linkages for use in solid-phase organic-synthesis" *J. Am. Chem. Soc.* **1995**, *117*, 11999-12000.
- [74] Routledge, A.; Stock, H. T.; Flitsch, S. L.; Turner, N. J. "New fluoride-labile linkers for solid-phase organic synthesis" *Tetrahedron Lett.* **1997**, *38*, 8287-8290.
- [75] Nakamura, K.; Hanai, N.; Kanno, M.; Kobayashi, A.; Ohnishi, Y.; Ito, Y.; Nakahara, Y. "Design and synthesis of silyl ether-based linker for solid-phase synthesis of glycopeptides" *Tetrahedron Lett.* **1999**, *40*, 515-518.
- [76] Chao, H. G.; Bernatowicz, M. S.; Reiss, P. D.; Klimas, C. E.; Matsueda, G. R. "A novel and versatile silicon-derived linkage agent, 4-[1-Hydroxy-2-(trimethylsilyl)ethyl]benzoic acid, compatible with the Fmoc/t-Bu strategy for solid-phase synthesis of C-terminal peptide acids" *J. Am. Chem. Soc.* **1994**, *116*, 1746-1752.
- [77] Wagner, M.; Kunz, H. "The (2-phenyl-2-trimethylsilyl)ethyl-(PTMSEL) linker - A novel linker for the solid-phase synthesis of protected peptides and glycopeptides cleavable with fluoride" *Angew. Chem., Int. Ed.* **2002**, *41*, 317-321.
- [78] Wagner, M.; Dziadek, S.; Kunz, H. "The (2-phenyl-2-trimethylsilyl)ethyl-(PTMSEL)-linker in the synthesis of glycopeptide partial structures of complex cell surface glycoproteins" *Chem.--Eur. J.* **2003**, *9*, 6018-6030.
- [79] Lumbierres, M.; Palomo, J. M.; Kragol, G.; Waldmann, H. "Solid-phase synthesis of palmitoylated and farnesylated lipopeptides employing the fluoride-labile PTMSEL linker" *Tetrahedron Lett.* **2006**, *47*, 2671-2674.
- [80] Fang, S. Y.; Bergstrom, D. E. "Fluoride-cleavable biotinylation phosphoramidite for 5'-end-labeling and affinity purification of synthetic oligonucleotides" *Nucleic Acids Res.* **2003**, *31*, 708-715.
- [81] Kwiatkowski, M.; Nilsson, M.; Landegren, U. "Synthesis of full-length oligonucleotides: Cleavage of apurinic molecules on a novel support" *Nucleic Acids Res.* **1996**, *24*, 4632-4638.
- [82] Limbach, P. A.; Crain, P. F.; McCloskey, J. A. "The modified nucleosides of RNA - Summary" *Nucleic Acids Res.* **1994**, *22*, 2183-2196.
- [83] Wada, T.; Kobori, A.; Kawahara, S. I.; Sekine, N. "Synthesis and hybridization ability of oligodeoxyribonucleotides incorporating N-acyldeoxycytidine derivatives" *Eur. J. Org. Chem.* **2001**, *2001*, 4583-4593.
- [84] Poijarvi-Virta, P.; Lönnberg, H. "Prodrug approaches of nucleotides and oligonucleotides" *Curr. Med. Chem.* **2006**, *13*, 3441-3465.
- [85] Pon, R. T.; Yu, S. Y. "Hydroquinone-O,O'-diacetic acid ('Q-linker') as a replacement for succinyl and oxalyl linker arms in solid phase oligonucleotide synthesis" *Nucleic Acids Res.* **1997**, *25*, 3629-3635.

- [86] Lavergne, T.; Parey, N.; Vasseur, J. J.; Debart, F. "Efficient release of base-sensitive oligonucleotides from solid supports using fluoride ions" *Eur. J. Org. Chem.* **2009**, 2190-2194.
- [87] Ohkubo, A.; Ezawa, Y.; Seio, K.; Sekine, M. "O-selectivity and utility of phosphorylation mediated by phosphite triester intermediates in the *N*-unprotected phosphoramidite method" *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 10884-10896.
- [88] Ohkubo, A.; Kasuya, R.; Aoki, K.; Kobori, A.; Taguchi, H.; Seio, K.; Sekine, M. "Efficient synthesis of functionalized oligodeoxyribonucleotides with base-labile groups using a new silyl linker" *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2008**, *16*, 5345-5351.
- [89] Ohkubo, A.; Noma, Y.; Aoki, K.; Tsunoda, H.; Seio, K.; Sekine, M. "Introduction of 3'-terminal nucleosides having a silyl-type linker into polymer supports without base protection" *J. Org. Chem.* **2009**, *74*, 2817-2823.
- [90] Pathak, T.; Waldmann, H. "Enzymes and protecting group chemistry" *Curr. Opin. Chem. Biol.* **1998**, *2*, 112-120.
- [91] Kadereit, D.; Waldmann, H. "Enzymatic protecting group techniques" *Chem. Rev. (Washington, DC, U. S.)* **2001**, *101*, 3367-3396.
- [92] Gross, R. A.; Kumar, A.; Kalra, B. "Polymer synthesis by in vitro enzyme catalysis" *Chem. Rev. (Washington, DC, U. S.)* **2001**, *101*, 2097-2124.
- [93] Reetz, M. T. "Combinatorial and evolution-based methods in the creation of enantioselective catalysts" *Angew. Chem., Int. Ed.* **2001**, *40*, 284-310.
- [94] van Rantwijk, F.; Lau, R. M.; Sheldon, R. A. "Biocatalytic transformations in ionic liquids" *Trends Biotechnol.* **2003**, *21*, 131-138.
- [95] Ran, N. Q.; Zhao, L. S.; Chen, Z. M.; Tao, J. H. "Recent applications of biocatalysis in developing green chemistry for chemical synthesis at the industrial scale" *Green Chem.* **2008**, *10*, 361-372.
- [96] Reents, R.; Jeyaraj, D. A.; Waldmann, H. "Biocatalysis in polymer-supported synthesis: Enzyme-labile linker groups" *Adv. Synth. Catal.* **2001**, *343*, 501-513.
- [97] Basso, A.; Braiuca, P.; Ebert, C.; Gardossi, L.; Linda, P. "Properties and applications of supports for enzyme-mediated transformations in solid phase synthesis" *J. Chem. Technol. Biotechnol.* **2006**, *81*, 1626-1640.
- [98] Laurent, N.; Haddoub, R.; Flitsch, S. L. "Enzyme catalysis on solid surfaces" *Trends Biotechnol.* **2008**, *26*, 328-337.
- [99] Weiler, J.; Gausepohl, H.; Hauser, N.; Jensen, O. N.; Hoheisel, J. D. "Hybridisation based DNA screening on peptide nucleic acid (PNA) oligomer arrays" *Nucleic Acids Res.* **1997**, *25*, 2792-2799.
- [100] Pfander, S.; Fiammengo, R.; Kirin, S. I.; Metzler-Nolte, N.; Jaschke, A. "Reversible site-specific tagging of enzymatically synthesized RNAs using aldehyde-hydrazine chemistry and protease-cleavable linkers" *Nucleic Acids Res.* **2007**, *35*, e25.
- [101] Yamada, K.; Nishimura, S. I. "An efficient synthesis of sialoglycoconjugates on a peptidase-sensitive polymer support" *Tetrahedron Lett.* **1995**, *36*, 9493-9496.
- [102] Yamada, K.; Fujita, E.; Nishimura, S. I. "High performance polymer supports for enzyme-assisted synthesis of glycoconjugates" *Carbohydr. Res.* **1997**, *305*, 443-461.
- [103] Rademann, J.; Grotli, M.; Meldal, M.; Bock, K. "SPOCC: A resin for solid-phase organic chemistry and enzymatic reactions on solid phase" *J. Am. Chem. Soc.* **1999**, *121*, 5459-5466.

- [104] Elmore, D. T.; Guthrie, D. J. S.; Wallace, A. D.; Bates, S. R. E. "An enzyme-scissile linker for solid-phase peptide-synthesis" *J. Chem. Soc., Chem. Commun.* **1992**, 1033-1034.
- [105] Schmitz, C.; Reetz, M. T. "Solid-phase enzymatic synthesis of oligonucleotides" *Org. Lett.* **1999**, *1*, 1729-1731.
- [106] Bohm, G.; Dowden, J.; Rice, D. C., *et al.* "A novel linker for the attachment of alcohols to solid supports" *Tetrahedron Lett.* **1998**, *39*, 3819-3822.
- [107] Grether, U.; Waldmann, H. "An enzyme-labile safety catch linker for combinatorial synthesis on a soluble polymeric support" *Angew. Chem., Int. Ed.* **2000**, *39*, 1629-1632.
- [108] Grether, U.; Waldmann, H. "An enzyme-labile safety catch linker for synthesis on a soluble polymeric support" *Chem.--Eur. J.* **2001**, *7*, 959-971.
- [109] Basso, A.; Ebert, C.; Gardossi, L.; Linda, P.; Phuong, T. T.; Zhu, M.; Wessjohann, L. "Penicillin G amidase-catalysed hydrolysis of phenylacetic hydrazides on a solid phase: A new route to enzyme-cleavable linkers" *Adv. Synth. Catal.* **2005**, *347*, 963-966.
- [110] Meyer, Y.; Richard, J. A.; Massonneau, M.; Renard, P. Y.; Romieu, A. "Development of a new nonpeptidic self-immolative spacer. Application to the design of protease sensing fluorogenic probes" *Org. Lett.* **2008**, *10*, 1517-1520.
- [111] Sauerbrei, B.; Jungmann, V.; Waldmann, H. "An enzyme-labile linker group for organic syntheses on solid supports" *Angew. Chem., Int. Ed.* **1998**, *37*, 1143-1146.
- [112] Pasini, D.; Filippini, M.; Pianetti, I.; Pregnotato, M. "Efficient biocatalytic cleavage and recovery of organic substrates supported on soluble polymers" *Adv. Synth. Catal.* **2007**, *349*, 971-978.
- [113] Baker, B. F. "Decapitation of a 5'-capped oligoribonucleotide by *O*-phenanthroline-Cu(II)" *J. Am. Chem. Soc.* **1993**, *115*, 3378-3379.
- [114] Chiang, M. Y.; Chan, H.; Zounes, M. A.; Freier, S. M.; Lima, W. F.; Bennett, C. F. "Antisense oligonucleotides inhibit Intercellular-Adhesion Molecule-1 expression by 2 distinct mechanisms" *J. Biol. Chem.* **1991**, *266*, 18162-18171.
- [115] Crooke, S. T. "Molecular mechanisms of action of antisense drugs" *Biochim. Biophys. Acta, Gene Struct. Expression* **1999**, *1489*, 31-44.
- [116] Sierakowska, H.; Gorman, L.; Kang, S. H.; Kole, R. "Antisense oligonucleotides and RNAs as modulators of pre-mRNA splicing" *Antisense Technol.* **2000**, *313*, 506-521.
- [117] Sazani, P.; Kole, R. "Therapeutic potential of antisense oligonucleotides as modulators of alternative splicing" *J. Clin. Invest.* **2003**, *112*, 481-486.
- [118] Aartsma-Rus, A.; Van Ommen, G. J. B. "Antisense-mediated exon skipping: A versatile tool with therapeutic and research applications" *RNA* **2007**, *13*, 1609-1624.
- [119] Baker, B. F.; Miraglia, L.; Hagedorn, C. H. "Modulation of eukaryotic initiation factor-4E binding to 5'-capped oligoribonucleotides by modified antisense oligonucleotides" *J. Biol. Chem.* **1992**, *267*, 11495-11499.
- [120] Zamaratski, E.; Pradeepkumar, P. I.; Chattopadhyaya, J. "A critical survey of the structure-function of the antisense oligo/RNA heteroduplex as substrate for RNase H" *J. Biochem. Biophys. Methods* **2001**, *48*, 189-208.

- [121] Eckstein, F. "Phosphorothioate oligodeoxynucleotides: What is their origin and what is unique about them?" *Antisense Nucleic Acid Drug Dev.* **2000**, *10*, 117-121.
- [122] Sahu, N. K.; Shilakari, G.; Nayak, A.; Kohli, D. V. "Antisense technology: A selective tool for gene expression regulation and gene targeting" *Curr. Pharm. Biotechnol.* **2007**, *8*, 291-304.
- [123] Declercq, E.; Eckstein, F.; Merigan, T. C. "Interferon induction increased through chemical modification of a synthetic polyribonucleotide" *Science* **1969**, *165*, 1137-1139.
- [124] Campbell, J. M.; Bacon, T. A.; Wickstrom, E. "Oligodeoxynucleoside phosphorothioate stability in subcellular extracts, culture media, sera and cerebrospinal-fluid" *J. Biochem. Biophys. Methods* **1990**, *20*, 259-267.
- [125] Crooke, S. T. "Progress in antisense technology: The end of the beginning" *Antisense Technol.* **2000**, *313*, 3-45.
- [126] Levin, A. A. "A review of issues in the pharmacokinetics and toxicology of phosphorothioate antisense oligonucleotides" *Biochim. Biophys. Acta, Gene Struct. Expression* **1999**, *1489*, 69-84.
- [127] Geary, R. S. "Antisense oligonucleotide pharmacokinetics and metabolism" *Expert Opin. Drug Metab. Toxicol.* **2009**, *5*, 381-391.
- [128] Koziolkiewicz, M.; Krakowiak, A.; Kwinkowski, M.; Boczkowska, M.; Stec, W. J. "Stereodifferentiation - The effect of P chirality of oligo(nucleoside phosphorothioates) on the activity of bacterial RNase H" *Nucleic Acids Res.* **1995**, *23*, 5000-5005.
- [129] Koziolkiewicz, M.; Wojcik, M.; Kobylanska, A.; Karwowski, B.; Rebowska, B.; Guga, P.; Stec, W. J. "Stability of stereoregular oligo(nucleoside phosphorothioate)s in human plasma: Diastereoselectivity of plasma 3'-exonuclease" *Antisense Nucleic Acid Drug Dev.* **1997**, *7*, 43-48.
- [130] Engels, J. W.; Uhlmann, E. "Chemistry of oligonucleotides" *Pharmacological aspects of oligonucleotides*. (Couvreur, P., Malvy, C. Ed.); Taylor & Francis: London, **2000**, 35-78.
- [131] Lebedev, A. V.; Wickstrom, E. "The chirality problem in P-substituted oligonucleotides" *Perspect. Drug Discovery Des.* **1996**, *4*, 17-40.
- [132] Guga, P.; Okruszek, A.; Stec, W. J. "Recent advances in stereocontrolled synthesis of P-chiral analogues of biophosphates" *Top. Cur. Chem. - New aspects in phosphorus chemistry I* **2002**, *220*, 169-200.
- [133] Lu, Y. X. "Recent advances in the stereocontrolled synthesis of antisense phosphorothioates" *Mini-Rev. Med. Chem.* **2006**, *6*, 319-330.
- [134] Oka, N.; Yamamoto, M.; Sato, T.; Wada, T. "Solid-phase synthesis of stereoregular oligodeoxyribonucleoside phosphorothioates using bicyclic oxazaphospholidine derivatives as monomer units" *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, *130*, 16031-16037.
- [135] Crooke, S. T. "Progress in antisense technology" *Annu. Rev. Med.* **2004**, *55*, 61-95.
- [136] Koshkin, A. A.; Rajwanshi, V. K.; Wengel, J. "Novel convenient syntheses of LNA [2.2.1]bicyclo nucleosides" *Tetrahedron Lett.* **1998**, *39*, 4381-4384.
- [137] Obika, S.; Nanbu, D.; Hari, Y.; Andoh, J.; Morio, K.; Doi, T.; Imanishi, T. "Stability and structural features of the duplexes containing nucleoside

- analogues with a fixed N-type conformation, 2'-O, 4'-C-methylenribonucleosides" *Tetrahedron Lett.* **1998**, *39*, 5401-5404.
- [138] Kurreck, J.; Wyszko, E.; Gillen, C.; Erdmann, V. A. "Design of antisense oligonucleotides stabilized by locked nucleic acids" *Nucleic Acids Res.* **2002**, *30*, 1911-1918.
- [139] Manoharan, M. "Oligonucleotide conjugates as potential antisense drugs with improved uptake, biodistribution, targeted delivery, and mechanism of action" *Antisense Nucleic Acid Drug Dev.* **2002**, *12*, 103-128.
- [140] De Fougerolles, A.; Vornlocher, H. P.; Maraganore, J.; Lieberman, J. "Interfering with disease: a progress report on siRNA-based therapeutics" *Nat. Rev. Drug Discovery* **2007**, *6*, 443-453.
- [141] Reinsch, C.; Siepi, E.; Dieckmann, A.; Panzer, S. "Chapter 10: Strategies for delivery of oligonucleotides in vivo" *Ther. Oligonucleotides*. (Kurreck, J. Ed.); Royal Society of Chemistry: Cambridge, **2008**, 226-240.
- [142] Zhao, X. B.; Pan, F.; Holt, C. M.; Lewis, A. L.; Lu, J. R. "Controlled delivery of antisense oligonucleotides: A brief review of current strategies" *Expert Opin. Drug Delivery* **2009**, *6*, 673-686.
- [143] Felgner, P. L.; Gadek, T. R.; Holm, M., *et al.* "Lipofection - A highly efficient, lipid-mediated DNA-transfection procedure" *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1987**, *84*, 7413-7417.
- [144] Micklefield, J. "Backbone modification of nucleic acids: Synthesis, structure and therapeutic applications" *Curr. Med. Chem.* **2001**, *8*, 1157-1179.
- [145] Kumar, V. A.; Ganesh, K. N. "Structure-editing of nucleic acids for selective targeting of RNA" *Curr. Top. Med. Chem.* **2007**, *7*, 715-726.
- [146] Bell, N. M.; Micklefield, J. "Chemical modification of oligonucleotides for therapeutic, bioanalytical and other applications" *ChemBioChem* **2009**, *10*, 2691-2703.
- [147] Miller, P. S.; Yano, J.; Yano, E.; Carroll, C.; Jayaraman, K.; Tso, P. O. P. "Non-ionic nucleic-acid analogs - Synthesis and characterization of dideoxyribonucleoside methylphosphonates" *Biochemistry* **1979**, *18*, 5134-5143.
- [148] Agarwal, K. L.; Riftina, F. "Synthesis and enzymatic properties of deoxyribooligonucleotides containing methyl and phenylphosphonate linkages" *Nucleic Acids Res.* **1979**, *6*, 3009-3024.
- [149] Samstag, W.; Engels, J. W. "Stereoselective synthesis of phosphate-modified building-blocks of DNA" *Angew. Chem., Int. Ed.* **1992**, *31*, 1386-1388.
- [150] Samstag, W. "Synthese, Charakterisierung und Anwendung phosphatmodifizierter DNA-Analoga." Dissertation, *Johann Wolfgang Goethe-Universität, Frankfurt am Main*, **1994**.
- [151] Singh, Y.; Spinelli, N.; Defrancq, E. "Chemical strategies for oligonucleotide-conjugates synthesis" *Curr. Org. Chem.* **2008**, *12*, 263-290.
- [152] Lönnberg, H. "Solid-Phase Synthesis of Oligonucleotide Conjugates Useful for Delivery and Targeting of Potential Nucleic Acid Therapeutics" *Bioconjugate Chem.* **2009**, *20*, 1065-1094.
- [153] Nobs, L.; Buchegger, F.; Gurny, R.; Allemann, E. "Current methods for attaching targeting ligands to liposomes and nanoparticles" *J. Pharm. Sci.* **2004**, *93*, 1980-1992.
- [154] Kichler, A. "Gene transfer with modified polyethylenimines" *J. Gene Med.* **2004**, *6*, S3-S10.

- [155] Allen, T. M. "Liposomal drug formulations - Rationale for development and what we can expect for the future" *Drugs* **1998**, *56*, 747-756.
- [156] Wess, G.; Enhnen, A.; Kramer, W. "Gallensäuren: Wiederentdeckt" *Nachr. Chem. Tech. Lab.* **1995**, *43*, 1047-1055.
- [157] Dawson, P. A.; Lan, T.; Rao, A. "Bile acid transporters" *J. Lipid Res.* **2009**, *50*, 2340-2357.
- [158] Kramer, W.; Stengelin, S.; Baringhaus, K. H., *et al.* "Substrate specificity of the ileal and the hepatic Na<sup>+</sup>/bile acid cotransporters of the rabbit. I. Transport studies with membrane vesicles and cell lines expressing the cloned transporters" *J. Lipid Res.* **1999**, *40*, 1604-1617.
- [159] Manoharan, M.; Johnson, L. K.; Bennett, C. F., *et al.* "Cholic-acid oligonucleotide conjugates for antisense applications" *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **1994**, *4*, 1053-1060.
- [160] Chow, T. Y. K.; Juby, C.; Brousseau, R. "Specific targeting of antisense oligonucleotides to neutrophils" *Antisense Res. Dev.* **1994**, *4*, 81-86.
- [161] Lehmann, T. "Synthese, Eigenschaften und Anwendung Gallensäure derivatisierter Antisense Oligonukleotide gegen Hepatitis C Virus RNA " Dissertation, *Johann Wolfgang Goethe-Universität, Frankfurt am Main*, **2001**.
- [162] Lehmann, T. J.; Engels, J. W. "Synthesis and properties of bile acid phosphoramidites 5'-tethered to antisense oligodeoxynucleotides against HCV" *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2001**, *9*, 1827-1835.
- [163] Lehmann, T. J.; Serwe, M.; Caselmann, W. H.; Engels, J. W. "Design and properties of hepatitis C virus antisense oligonucleotides for liver specific drug targeting" *Nucleosides, Nucleotides Nucleic Acids* **2001**, *20*, 1343-1346.
- [164] Kramer, W.; Wess, G.; Schubert, G., *et al.* "Liver-specific drug targeting by coupling to bile-acids" *J. Biol. Chem.* **1992**, *267*, 18598-18604.
- [165] Kramer, W.; Wess, G. "Bile acid transport systems as pharmaceutical targets" *Eur. J. Clin. Invest.* **1996**, *26*, 715-732.
- [166] Kullak-Ublick, G. A.; Glasa, J.; Boker, C., *et al.* "Chlorambucil-taurocholate is transported by bile acid carriers expressed in human hepatocellular carcinomas" *Gastroenterology* **1997**, *113*, 1295-1305.
- [167] Yang, C.; Tirucherai, G. S.; Mitra, A. K. "Prodrug based optimal drug delivery via membrane transporter/receptor" *Expert Opin. Biol. Ther.* **2001**, *1*, 159-175.
- [168] Sievaen, E. "Exploitation of bile acid transport systems in prodrug design" *Molecules* **2007**, *12*, 1859-1889.
- [169] Barber, I.; Rayner, B.; Imbach, J. L. "The prooligonucleotide approach. 1. Esterase-mediated reversibility of dithymidine-S-alkyl-phosphorothiolates to dithymidine phosphorothioates" *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **1995**, *5*, 563-568.
- [170] Barber, I.; Tosquellas, G.; Morvan, F.; Rayner, B.; Imbach, J. L. "The prooligonucleotide approach. 2. Synthesis and stability studies of chimeric oligonucleotide models" *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **1995**, *5*, 1441-1444.
- [171] Tosquellas, G.; Alvarez, K.; Dell'Aquila, C.; Morvan, F.; Vasseur, J. J.; Imbach, J. L.; Rayner, B. "The pro-oligonucleotide approach: solid phase synthesis and preliminary evaluation of model pro-dodecathymidylates" *Nucleic Acids Res.* **1998**, *26*, 2069-2074.
- [172] Ouyang, D.; Shah, N.; Zhang, H.; Smith, S. C.; Parekh, H. S. "Reducible disulfide-based non-viral gene delivery systems" *Mini-Rev. Med. Chem.* **2009**, *9*, 1242-1250.

- [173] Bauhuber, S.; Hozsa, C.; Breunig, M.; Gopferich, A. "Delivery of nucleic acids via disulfide-based carrier systems" *Adv. Mater.* **2009**, *21*, 3286-3306.
- [174] Astriab-Fisher, A.; Sergueev, D.; Fisher, M.; Shaw, B. R.; Juliano, R. L. "Conjugates of antisense oligonucleotides with the Tat and Antennapedia cell-penetrating peptides: Effects on cellular uptake, binding to target sequences, and biologic actions" *Pharm. Res.* **2002**, *19*, 744-754.
- [175] Muratovska, A.; Eccles, M. R. "Conjugate for efficient delivery of short interfering RNA (siRNA) into mammalian cells" *FEBS Lett.* **2004**, *558*, 63-68.
- [176] Rajur, S. B.; Roth, C. M.; Morgan, J. R.; Yarmush, M. L. "Covalent protein-oligonucleotide conjugates for efficient delivery of antisense molecules" *Bioconjugate Chem.* **1997**, *8*, 935-940.
- [177] Bonfils, E.; Depierreux, C.; Midoux, P.; Thuong, N. T.; Monsigny, M.; Roche, A. C. "Drug targeting - Synthesis and endocytosis of oligonucleotide-neoglycoprotein conjugates" *Nucleic Acids Res.* **1992**, *20*, 4621-4629.
- [178] Greenwald, R. B.; Pendri, A.; Conover, C. D., *et al.* "Drug delivery systems employing 1,4- or 1,6-elimination: Poly(ethyleneglycol) prodrugs of amine-containing compounds" *J. Med. Chem.* **1999**, *42*, 3657-3667.
- [179] Turner, J. J.; Ivanova, G. D.; Verbeure, B., *et al.* "Cell-penetrating peptide conjugates of peptide nucleic acids (PNA) as inhibitors of HIV-1 Tat-dependent trans-activation in cells" *Nucleic Acids Res.* **2005**, *33*, 6837-6849.
- [180] Bendifallah, N.; Rasmussen, F. W.; Zachar, V.; Ebbesen, P.; Nielsen, P. E.; Koppelhus, U. "Evaluation of cell-penetrating peptides (CPPs) as vehicles for intracellular delivery of antisense peptide nucleic acid (PNA)" *Bioconjugate Chem.* **2006**, *17*, 750-758.
- [181] Zhao, H.; Peng, P.; Longley, C., *et al.* "Delivery of G3139 using releasable PEG-linkers: Impact on pharmacokinetic profile and anti-tumor efficacy" *J. Controlled Release* **2007**, *119*, 143-152.
- [182] Bayley, H. "Sequencing single molecules of DNA" *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2006**, *10*, 628-637.
- [183] Mitchelson, K. R.; Hawkes, D. B.; Turakulov, R.; Men, A. E. "Overview: developments in DNA sequencing" *Perspect. Bioanal.* **2007**, *2*, 3-44.
- [184] Shendure, J. A.; Porreca, G. J.; Church, G. M. "Overview of DNA sequencing strategies" *Curr. Protoc. Mol. Biol.* **2008**, *Chapter 7*, Unit 7.1.
- [185] Shendure, J.; Ji, H. L. "Next-generation DNA sequencing" *Nat. Biotechnol.* **2008**, *26*, 1135-1145.
- [186] Metzker, M. L. "Advances in next-generation DNA sequencing technologies" *Comparative Genomics - Basic and Applied Research*. (Brown, J. R. Ed.); CRC Press: Boca Raton, **2008**, 13-28.
- [187] Lin, B.; Wang, J.; Cheng, Y. "Recent patents and advances in the next-generation sequencing technologies" *Recent Pat. Biomed. Eng.* **2008**, *1*, 60-67.
- [188] Voelkerding, K. V.; Dames, S. A.; Durtschi, J. D. "Next-Generation Sequencing: From basic research to diagnostics" *Clin. Chem.* **2009**, *55*, 641-658.
- [189] Treffer, R.; Deckert, V. "Recent advances in single-molecule sequencing" *Curr. Opin. Biotechnol.* **2010**, *21*, 4-11.
- [190] Hyman, E. D. "A new method of sequencing DNA" *Anal. Biochem.* **1988**, *174*, 423-436.
- [191] Nyren, P.; Lundin, A. "Enzymatic method for continuous monitoring of inorganic pyrophosphate synthesis" *Anal. Biochem.* **1985**, *151*, 504-509.

- [192] Nyren, P.; Pettersson, B.; Uhlen, M. "Solid-phase DNA Minisequencing by an enzymatic luminometric inorganic pyrophosphate detection assay" *Anal. Biochem.* **1993**, *208*, 171-175.
- [193] Ronaghi, M.; Karamohamed, S.; Pettersson, B.; Uhlen, M.; Nyren, P. "Real-time DNA sequencing using detection of pyrophosphate release" *Anal. Biochem.* **1996**, *242*, 84-89.
- [194] Ronaghi, M. "Pyrosequencing sheds light on DNA sequencing" *Genome Res.* **2001**, *11*, 3-11.
- [195] Ronaghi, M.; Uhlen, M.; Nyren, P. "A sequencing method based on real-time pyrophosphate" *Science* **1998**, *281*, 363-365.
- [196] Ronaghi, M. "Improved performance of pyrosequencing using single-stranded DNA-binding protein" *Anal. Biochem.* **2000**, *286*, 282-288.
- [197] Margulies, M.; Egholm, M.; Altman, W. E., *et al.* "Genome sequencing in microfabricated high-density picolitre reactors" *Nature* **2005**, *437*, 376-380.
- [198] Rusk, N.; Kiermer, V. "Primer: Sequencing--the next generation" *Nat. Methods* **2008**, *5*, 15.
- [199] Tawfik, D. S.; Griffiths, A. D. "Man-made cell-like compartments for molecular evolution" *Nat. Biotechnol.* **1998**, *16*, 652-656.
- [200] Andries, K.; Verhasselt, P.; Guillemont, J., *et al.* "A diarylquinoline drug active on the ATP synthase of *Mycobacterium tuberculosis*" *Science* **2005**, *307*, 223-227.
- [201] Oh, J. D.; Kling-Backhed, H.; Giannakis, M., *et al.* "The complete genome sequence of a chronic atrophic gastritis *Helicobacter pylori* strain: Evolution during disease progression" *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2006**, *103*, 9999-10004.
- [202] Hefler, L. A.; Mustea, A.; Konsgen, D., *et al.* "Vascular endothelial growth factor gene polymorphisms are associated with prognosis in ovarian cancer" *Clin. Cancer Res.* **2007**, *13*, 898-901.
- [203] Hopkins, K. L.; Arnold, C.; Threlfall, E. J. "Rapid detection of gyrA and parC mutations in quinolone-resistant *Salmonella enterica* using Pyrosequencing (R) technology" *J. Microbiol. Methods* **2007**, *68*, 163-171.
- [204] van der Straaten, R.; Wessels, J. A. M.; De Vries-Bouwstra, J. K., *et al.* "Exploratory analysis of four polymorphisms in human GGH and FPGS genes and their effect in metho trexate-treated rheumatoid arthritis patients" *Pharmacogenomics* **2007**, *8*, 141-150.
- [205] Green, R. E.; Krause, J.; Ptak, S. E., *et al.* "Analysis of one million base pairs of Neanderthal DNA" *Nature* **2006**, *444*, 330-336.
- [206] Poinar, H. N.; Schwarz, C.; Qi, J., *et al.* "Metagenomics to paleogenomics: Large-scale sequencing of mammoth DNA" *Science* **2006**, *311*, 392-394.
- [207] Shendure, J.; Porreca, G. J.; Reppas, N. B., *et al.* "Accurate multiplex polony sequencing of an evolved bacterial genome" *Science* **2005**, *309*, 1728-1732.
- [208] Porreca, G. J.; Zhang, K.; Li, J. B., *et al.* "Multiplex amplification of large sets of human exons" *Nat. Methods* **2007**, *4*, 931-936.
- [209] Nardi, V.; Raz, T.; Cao, X., *et al.* "Quantitative monitoring by polymerase colony assay of known mutations resistant to ABL kinase inhibitors" *Oncogene* **2008**, *27*, 775-782.
- [210] Soni, G. V.; Meller, A. "Progress toward ultrafast DNA Sequencing using solid-state nanopores" *Clin. Chem.* **2007**, *53*, 1996-2001.



- [211] Cockroft, S. L.; Chu, J.; Amarin, M.; Ghadiri, M. R. "A single-molecule nanopore device detects DNA polymerase activity with single-nucleotide resolution" *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, *130*, 818-820.
- [212] Stoddart, D.; Heron, A. J.; Mikhailova, E.; Maglia, G.; Bayley, H. "Single-nucleotide discrimination in immobilized DNA oligonucleotides with a biological nanopore" *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2009**, *106*, 7702-7707.
- [213] Gu, L. Q.; Shim, J. W. "Single molecule sensing by nanopores and nanopore devices" *Analyst* **2010**, *135*, 441-451.
- [214] Nguyen, D. C.; Keller, R. A.; Jett, J. H.; Martin, J. C. "Detection of single molecules of phycoerythrin in hydrodynamically focused flows by laser-induced fluorescence" *Anal. Chem.* **1987**, *59*, 2158-2161.
- [215] Ambrose, W. P.; Goodwin, P. M.; Jett, J. H., *et al.* "Application of single-molecule detection to DNA-sequencing and sizing" *Ber. Bunsen Ges Phys. Chem. Chem. Phys.* **1993**, *97*, 1535-1542.
- [216] Eigen, M.; Rigler, R. "Sorting single molecules - Application to diagnostics and evolutionary biotechnology" *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1994**, *91*, 5740-5747.
- [217] Dörre, K.; Brakmann, S.; Brinkmeier, M., *et al.* "Technique for single molecule sequencing" *Bioimaging* **1997**, *5*, 139-152.
- [218] Braslavsky, I.; Hebert, B.; Kartalov, E.; Quake, S. R. "Sequence information can be obtained from single DNA molecules" *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2003**, *100*, 3960-3964.
- [219] Levene, M. J.; Korlach, J.; Turner, S. W.; Foquet, M.; Craighead, H. G.; Webb, W. W. "Zero-mode waveguides for single-molecule analysis at high concentrations" *Science* **2003**, *299*, 682-686.
- [220] Eid, J.; Fehr, A.; Gray, J., *et al.* "Real-time DNA sequencing from single polymerase molecules" *Science* **2009**, *323*, 133-138.
- [221] Kahvejian, A.; Kellett, S. "Making single-molecule sequencing a reality" *Am. Lab.* **2008**, *40*, 48-53.
- [222] Bowers, J.; Mitchell, J.; Beer, E., *et al.* "Virtual terminator nucleotides for next-generation DNA sequencing" *Nat. Methods* **2009**, *6*, 593-595.
- [223] Lipson, D.; Raz, T.; Kieu, A., *et al.* "Quantification of the yeast transcriptome by single-molecule sequencing" *Nat. Biotechnol.* **2009**, *27*, 652-658.
- [224] Harris, T. D.; Buzby, P. R.; Babcock, H., *et al.* "Single-molecule DNA sequencing of a viral genome" *Science* **2008**, *320*, 106-109.
- [225] Pushkarev, D.; Neff, N. F.; Quake, S. R. "Single-molecule sequencing of an individual human genome" *Nat. Biotechnol.* **2009**, *27*, 847-850.
- [226] Korlach, J.; Bibillo, A.; Wegener, J., *et al.* "Long, processive enzymatic DNA synthesis using 100% dye-labeled terminal phosphate-linked nucleotides" *Nucleosides, Nucleotides Nucleic Acids* **2008**, *27*, 1072-1083.
- [227] Ibach, J.; Brakmann, S. "Sequencing single DNA molecules in real time" *Angew. Chem., Int. Ed.* **2009**, *48*, 4683-4685.
- [228] Shendure, J.; Mitra, R. D.; Varma, C.; Church, G. M. "Advanced sequencing technologies: Methods and goals" *Nat. Rev. Genet.* **2004**, *5*, 335-344.
- [229] Wu, W.; Stupi, B. P.; Litosh, V. A., *et al.* "Termination of DNA synthesis by  $N^6$ -alkylated, not 3'-O-alkylated, photocleavable 2-deoxyadenosine triphosphates" *Nucleic Acids Res.* **2007**, *35*, 6339-6349.

- [230] Turcatti, G.; Romieu, A.; Fedurco, M.; Tairi, A. P. "A new class of cleavable fluorescent nucleotides: synthesis and optimization as reversible terminators for DNA sequencing by synthesis" *Nucleic Acids Res.* **2008**, *36*, e25.
- [231] Tabor, S.; Richardson, C. C. "A single residue in DNA polymerases of the *Escherichia coli* DNA polymerase I family is critical for distinguishing between deoxy- and dideoxyribonucleotides" *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1995**, *92*, 6339-6343.
- [232] Fa, M.; Radeghieri, A.; Henry, A. A.; Romesberg, F. E. "Expanding the substrate repertoire of a DNA polymerase by directed evolution" *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 1748-1754.
- [233] Canard, B.; Cardona, B.; Sarfati, R. S. "Catalytic editing properties of DNA polymerases" *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1995**, *92*, 10859-10863.
- [234] Canard, B.; Sarfati, R. S. "DNA polymerase fluorescent substrates with reversible 3'-tags" *Gene* **1994**, *148*, 1-6.
- [235] Metzker, M. L.; Raghavachari, R.; Richards, S.; Jacutin, S. E.; Civitello, A.; Burgess, K.; Gibbs, R. A. "Termination of DNA synthesis by novel 3'-modified-deoxyribonucleosides 5'-triphosphates" *Nucleic Acids Res.* **1994**, *22*, 4259-67.
- [236] Welch, M. B.; Burgess, K. "Synthesis of fluorescent, photolabile 3'-*O*-protected nucleoside triphosphate for the base addition sequencing scheme " *Nucleosides Nucleotides* **1999**, *18*, 197-201.
- [237] Pelletier, H.; Sawaya, M. R.; Kumar, A.; Wilson, S. H.; Kraut, J. "Structures of ternary complexes of rat DNA-polymerase- $\beta$ , a DNA template-primer, and ddCTP" *Science* **1994**, *264*, 1891-1903.
- [238] Kumar, S.; Fuller, C. W. "Advances in dye-nucleotide conjugate chemistry for DNA sequencing" *Perspect. Bioanal.* **2007**, *2*, 119-149.
- [239] Edwards, J. R.; Kim, D. H.; Ju, J. "An integrated system for DNA sequencing by synthesis" *Perspect. Bioanal.* **2007**, *2*, 187-205.
- [240] Guo, J.; Yu, L.; Turro, N. J.; Ju, J. Y. "An integrated system for DNA sequencing by synthesis using novel nucleotide analogues" *Acc. Chem. Res.* **2009**, *43*, 551-563.
- [241] Li, Z.; Bai, X.; Ruparel, H.; Kim, S.; Turro, N. J.; Ju, J. "A photocleavable fluorescent nucleotide for DNA sequencing and analysis" *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2003**, *100*, 414-419.
- [242] Seo, T. S.; Bai, X.; Ruparel, H.; Li, Z.; Turro, N. J.; Ju, J. "Photocleavable fluorescent nucleotides for DNA sequencing on a chip constructed by site-specific coupling chemistry" *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2004**, *101*, 5488-5493.
- [243] Seo, T. S.; Bai, X.; Kim, D. H., *et al.* "Four-color DNA sequencing by synthesis on a chip using photocleavable fluorescent nucleotides" *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2005**, *102*, 5926-5931.
- [244] Bi, L. R.; Kim, D. H.; Ju, J. Y. "Design and synthesis of a chemically cleavable fluorescent nucleotide, 3'-*O*-allyl-dGTP-allyl-bodipy-FL-510, as a reversible terminator for DNA sequencing by synthesis" *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128*, 2542-2543.
- [245] Ju, J. Y.; Kim, D. H.; Bi, L. R., *et al.* "Four-color DNA sequencing by synthesis using cleavable fluorescent nucleotide reversible terminators" *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2006**, *103*, 19635-19640.

- [246] Ruparel, H.; Bi, L.; Li, Z.; Bai, X.; Kim, D. H.; Turro, N. J.; Ju, J. "Design and synthesis of a 3'-O-allyl photocleavable fluorescent nucleotide as a reversible terminator for DNA sequencing by synthesis" *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2005**, *102*, 5932-5937.
- [247] Meng, Q. L.; Kim, D. H.; Bai, X. P.; Bi, L. R.; Turro, N. J.; Ju, J. Y. "Design and synthesis of a photocleavable fluorescent nucleotide 3'-O-allyl-dGTP-PC-bodipy-FL-510 as a reversible terminator for DNA sequencing by synthesis" *J. Org. Chem.* **2006**, *71*, 3248-3252.
- [248] Guo, J.; Xu, N.; Li, Z. M., *et al.* "Four-color DNA sequencing with 3'-O-modified nucleotide reversible terminators and chemically cleavable fluorescent dideoxynucleotides" *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2008**, *105*, 9145-9150.
- [249] Milton, J. W., X.; Smith, M.; Brennan, J. S.; Barnes, C. L.; Liu, X.; Ruediger, S., *Modified Nucleotides* WO 2004/018497, **2004**.
- [250] Bentley, D. R.; Balasubramanian, S.; Swerdlow, H. P., *et al.* "Accurate whole human genome sequencing using reversible terminator chemistry" *Nature* **2008**, *456*, 53-59.
- [251] Fedurco, M.; Romieu, A.; Williams, S.; Lawrence, I.; Turcatti, G. "BTA, a novel reagent for DNA attachment on glass and efficient generation of solid-phase amplified DNA colonies" *Nucleic Acids Res.* **2006**, *34*, e22.
- [252] Erlich, Y.; Mitra, P. P.; De La Bastide, M.; McCombie, W. R.; Hannon, G. J. "Alta-Cyclic: A selfoptimizing base caller for next-generation sequencing" *Nat. Methods* **2008**, *5*, 679-682.
- [253] Quail, M. A.; Kozarewa, I.; Smith, F., *et al.* "A large genome center's improvements to the Illumina sequencing system" *Nat. Methods* **2008**, *5*, 1005-1010.
- [254] Johnson, D. S.; Mortazavi, A.; Myers, R. M.; Wold, B. "Genome-wide mapping of in vivo protein-DNA interactions" *Science* **2007**, *316*, 1497-1502.
- [255] Fields, S. "Site-seeing by sequencing" *Science* **2007**, *316*, 1441-1442.
- [256] Barski, A.; Cuddapah, S.; Cui, K. R., *et al.* "High-resolution profiling of histone methylations in the human genome" *Cell* **2007**, *129*, 823-837.
- [257] Bebenek, K.; Kunkel, T. A. "Functions of DNA polymerases" *DNA Repair and Replication*. Elsevier Academic Press Inc: San Diego, **2004**, 137-165.
- [258] Kunkel, T. A.; Erie, D. A. "DNA mismatch repair" *Annu. Rev. Biochem.* **2005**, *74*, 681-710.
- [259] Garcia-Diaz, M.; Bebenek, K. "Multiple functions of DNA polymerases" *Crit. Rev. Plant Sci.* **2007**, *26*, 105-122.
- [260] Braithwaite, D. K.; Ito, J. "Compilation, alignment, and phylogenetic-relationships of DNA-polymerases" *Nucleic Acids Res.* **1993**, *21*, 787-802.
- [261] Ollis, D. L.; Brick, P.; Hamlin, R.; Xuong, N. G.; Steitz, T. A. "Structure of large fragment of *Escherichia coli* DNA-polymerase-I complexed with dTMP" *Nature* **1985**, *313*, 762-766.
- [262] Sawaya, M. R.; Pelletier, H.; Kumar, A.; Wilson, S. H.; Kraut, J. "Crystal-structure of rat DNA-polymerase- $\beta$  - Evidence for a common polymerase mechanism" *Science* **1994**, *264*, 1930-1935.
- [263] Pelletier, H. "Polymerase structures and mechanism" *Science* **1994**, *266*, 2025-2026.

- [264] Kiefer, J. R.; Mao, C.; Braman, J. C.; Beese, L. S. "Visualizing DNA replication in a catalytically active *Bacillus* DNA polymerase crystal" *Nature* **1998**, *391*, 304-307.
- [265] Doublie, S.; Tabor, S.; Long, A. M.; Richardson, C. C.; Ellenberger, T. "Crystal structure of a bacteriophage T7 DNA replication complex at 2.2 angstrom resolution" *Nature* **1998**, *391*, 251-258.
- [266] Doublie, S.; Ellenberger, T. "The mechanism of action of T7 DNA polymerase" *Curr. Opin. Struct. Biol.* **1998**, *8*, 704-712.
- [267] Steitz, T. A. "DNA polymerases: Structural diversity and common mechanisms" *J. Biol. Chem.* **1999**, *274*, 17395-17398.
- [268] Patel, P. H.; Loeb, L. A. "Getting a grip on how DNA polymerases function" *Nat. Struct. Biol.* **2001**, *8*, 656-659.
- [269] Liu, D. Y.; Moran, S.; Kool, E. T. "Bi-stranded, multisite replication of a base pair between difluorotoluene and adenine: confirmation by 'inverse' sequencing" *Chem. Biol.* **1997**, *4*, 919-926.
- [270] Moran, S.; Ren, R. X. F.; Kool, E. T. "A thymidine triphosphate shape analog lacking Watson-Crick pairing ability is replicated with high sequence selectivity" *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1997**, *94*, 10506-10511.
- [271] Derbyshire, V.; Freemont, P. S.; Sanderson, M. R.; Beese, L.; Friedman, J. M.; Joyce, C. M.; Steitz, T. A. "Genetic and crystallographic studies of the 3',5'-exonucleolytic site of DNA-polymerase-I" *Science* **1988**, *240*, 199-201.
- [272] Freemont, P. S.; Friedman, J. M.; Beese, L. S.; Sanderson, M. R.; Steitz, T. A. "Cocrystal structure of an editing complex of Klenow fragment with DNA" *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1988**, *85*, 8924-8928.
- [273] Beese, L. S.; Steitz, T. A. "Structural basis for the 3'-5'-exonuclease activity of *Escherichia coli* DNA-polymerase-I - A 2 metal-ion mechanism" *EMBO J.* **1991**, *10*, 25-33.
- [274] Sawaya, M. R.; Prasad, R.; Wilson, S. H.; Kraut, J.; Pelletier, H. "Crystal structures of human DNA polymerase- $\beta$  complexed with gapped and nicked DNA: Evidence for an induced fit mechanism" *Biochemistry* **1997**, *36*, 11205-11215.
- [275] Strerath, M.; Cramer, J.; Restle, T.; Marx, A. "Implications of active site constraints on varied DNA polymerase selectivity" *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, *124*, 11230-11231.
- [276] Marx, A.; MacWilliams, M. P.; Bickle, T. A.; Schwitter, U.; Giese, B. "4'-acylated thymidines: A new class of DNA chain terminators and photocleavable DNA building blocks" *J. Am. Chem. Soc.* **1997**, *119*, 1131-1132.
- [277] Di Pasquale, F.; Fischer, D.; Grohmann, D.; Restle, T.; Geyer, A.; Marx, A. "Opposed steric constraints in human DNA polymerase  $\beta$  and *E. coli* DNA polymerase I" *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, *130*, 10748-10757.
- [278] Summerer, D.; Rudinger, N. Z.; Detmer, I.; Marx, A. "Enhanced fidelity in mismatch extension by DNA polymerase through directed combinatorial enzyme design" *Angew. Chem., Int. Ed.* **2005**, *44*, 4712-4715.
- [279] Kranaster, R.; Ketzer, P.; Marx, A. "Mutant DNA polymerase for improved detection of single-nucleotide variations in microarrayed primer extension" *ChemBioChem* **2008**, *9*, 694-697.
- [280] Gibbs, R. A.; Belmont, J. W.; Hardenbol, P., *et al.* "The International HapMap Project" *Nature* **2003**, *426*, 789-796.

- [281] Syvanen, A. C. "From gels to chips: "Minisequencing" primer extension for analysis of point mutations and single nucleotide polymorphisms" *Hum. Mutat.* **1999**, *13*, 1-10.
- [282] Syvanen, A. C. "Accessing genetic variation: Genotyping single nucleotide polymorphisms" *Nat. Rev. Genet.* **2001**, *2*, 930-942.
- [283] Kim, S.; Misra, A. "SNP genotyping: Technologies and biomedical applications" *Annu. Rev. Biomed. Eng.* **2007**, *9*, 289-320.
- [284] Hirschhorn, J. N.; Sklar, P.; Lindblad-Toh, K., *et al.* "SBE-TAGS: An array-based method for efficient single-nucleotide polymorphism genotyping" *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2000**, *97*, 12164-12169.
- [285] Kennedy, G. C.; Matsuzaki, H.; Dong, S. L., *et al.* "Large-scale genotyping of complex DNA" *Nat. Biotechnol.* **2003**, *21*, 1233-1237.
- [286] Sigurdsson, S.; Hedman, M.; Sistonen, P.; Sajantila, A.; Syvanen, A. C. "A microarray system for genotyping 150 single nucleotide polymorphisms in the coding region of human mitochondrial DNA" *Genomics* **2006**, *87*, 534-542.
- [287] Tebbutt, S. J.; Mercer, G. D.; Do, R.; Tripp, B. W.; Wong, A. W. M.; Ruan, J. "Deoxynucleotides can replace dideoxynucleotides in minisequencing by arrayed primer extension" *Biotechniques* **2006**, *40*, 331-338.
- [288] Shumaker, J. M.; Metspalu, A.; Caskey, C. T. "Mutation detection by solid phase primer extension" *Hum. Mutat.* **1996**, *7*, 346-354.
- [289] Pastinen, T.; Kurg, A.; Metspalu, A.; Peltonen, L.; Syvanen, A. C. "Minisequencing: A specific tool for DNA analysis and diagnostics on oligonucleotide arrays" *Genome Res.* **1997**, *7*, 606-614.
- [290] Kurg, A.; Tonisson, N.; Georgiou, I.; Shumaker, J.; Tollett, J.; Metspalu, A. "Arrayed primer extension: Solid-phase four-color DNA resequencing and mutation detection technology" *Genet. Test.* **2000**, *4*, 1-7.
- [291] Kwiatkowski, M., *Novel chain terminators, the use thereof for nucleic acid sequencing and synthesis and a method of their preparation* EP 0808320, **1996**.
- [292] Kwiatkowski, M., *Chain terminators, the use thereof for nucleic acid sequencing and synthesis and a method of their preparation* US 6255475, **2001**.
- [293] Kwiatkowski, M., *Compounds for protecting hydroxyls and methods for their use* US 6309836, **2001**.
- [294] Kwiatkowski, M., *Compounds for protecting hydroxyls and methods for their use* US 2004/0175726, **2004**.
- [295] Metzker, M. L.; Raghavachari, R.; Burgess, K.; Gibbs, R. A. "Elimination of residual natural nucleotides from 3'-O-modified-dNTP syntheses by enzymatic mop-up" *Biotechniques* **1998**, *25*, 814-817.
- [296] Meyer, P. R.; Matsuura, S. E.; So, R. G.; Scott, W. A. "Unblocking of chain-terminated primer by HIV-1 reverse transcriptase through a nucleotide-dependent mechanism" *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1998**, *95*, 13471-13476.
- [297] Saneyoshi, H.; Seio, K.; Sekine, M. "A general method for the synthesis of 2'-O-cyanoethylated oligoribonucleotides having promising hybridization affinity for DNA and RNA and enhanced nuclease resistance" *J. Org. Chem.* **2005**, *70*, 10453-10460.
- [298] Keller, A. "Synthesis and enzymatic testing of reversible terminators for sequencing-by-synthesis (SBS)" Dissertation, *Johann Wolfgang Goethe-Universität, Frankfurt am Main*, **2009**.

- [299] Balasing, K.; Warburto, D.; Dunnill, P.; Lilly, M. D. "Isolation and kinetics of Penicillin Amidase from *Escherichia coli*" *Biochim. Biophys. Acta* **1972**, 276, 250-256.
- [300] Warburto, D.; Balashin, K.; Dunnill, P.; Lilly, M. D. "Preparation and kinetics of immobilized Penicillin Amidase from *Escherichia coli*" *Biochim. Biophys. Acta* **1972**, 284, 278-284.
- [301] Kasche, V.; Haufler, U.; Markowsky, D.; Melnyk, S.; Zeich, A.; Galunsky, B. "Penicillin Amidase from *Escherichia coli* - Enzyme heterogeneity and stability" *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **1987**, 501, 97-102.
- [302] Kasche, V.; Lummer, K.; Nurk, A.; Piotraschke, E.; Rieks, A.; Stoeva, S.; Voelter, W. "Intramolecular autoproteolysis initiates the maturation of Penicillin Amidase from *Escherichia coli*" *Biochim. Biophys. Acta, Protein Struct. Mol. Enzymol.* **1999**, 1433, 76-86.
- [303] Dodson, G. G. "Catalysis in Penicillin G Amidase - a member of the Ntn (N terminal nucleophile) hydrolase family" *Croat. Chem. Acta* **2000**, 73, 901-908.
- [304] Hewitt, L.; Kasche, V.; Lummer, K., *et al.* "Structure of a slow processing precursor Penicillin Acylase from *Escherichia coli* reveals the linker peptide blocking the active-site cleft" *J. Mol. Biol.* **2000**, 302, 887-898.
- [305] Duggleby, H. J.; Tolley, S. P.; Hill, C. P.; Dodson, E. J.; Dodson, G.; Moody, P. C. E. "Penicillin Acylase has a single-amino-acid catalytic center" *Nature* **1995**, 373, 264-268.
- [306] Bruggink, A.; Roos, E. C.; De Vroom, E. "Penicillin Acylase in the industrial production of  $\beta$ -lactam antibiotics" *Org. Process Res. Dev.* **1998**, 2, 128-133.
- [307] Wegman, M. A.; Janssen, M. H. A.; van Rantwijk, F.; Sheldon, R. A. "Towards biocatalytic synthesis of  $\beta$ -lactam antibiotics" *Adv. Synth. Catal.* **2001**, 343, 559-576.
- [308] Kasche, V.; Galunsky, B. "Enzyme-catalyzed biotransformations in aqueous 2-phase systems with precipitated substrate and/or product" *Biotechnol. Bioeng.* **1995**, 45, 261-267.
- [309] Basso, A.; Biffi, S.; De Martin, L.; Gardossi, L.; Linda, P. "Quantitative acylation of amino compounds catalysed by Penicillin G Acylase in organic solvent at controlled water activity" *Croat. Chem. Acta* **2001**, 74, 757-762.
- [310] Pan, S. B.; Wu, Q.; Chen, C. X.; Lin, X. F. "Efficient enzymatic synthesis of ampicillin in organic media" *J. Mol. Catal. B: Enzym.* **2008**, 54, 13-18.
- [311] Waldmann, H. "The Phenylacetyl (Phac) group as enzymatically removable protecting function for peptides and carbohydrates - Selective deprotections with Penicillin Acylase" *Liebigs Ann. Chem.* **1988**, 1175-1180.
- [312] Waldmann, H. "The use of Penicillin Acylase for selective N-terminal deprotection in peptide-synthesis" *Tetrahedron Lett.* **1988**, 29, 1131-1134.
- [313] Schelhaas, M.; Waldmann, H. "Protecting group strategies in organic synthesis" *Angew. Chem., Int. Ed.* **1996**, 35, 2056-2083.
- [314] Doolittle, R. F.; Armentro, R. W. "Pyrrolidonyl Peptidase. An enzyme for selective removal of pyrrolidonecarboxylic acid residues from polypeptides" *Biochemistry* **1968**, 7, 516-521.
- [315] Szewczuk, A.; Kwiatkow, J. "Pyrrolidonyl Peptidase in animal, plant and human tissues - Occurrence and some properties of enzyme" *Eur. J. Biochem.* **1970**, 15, 92-96.

- [316] Tsunasawa, S.; Nakura, S.; Tanigawa, T.; Kato, I. "Pyrrolidone carboxyl peptidase from the hyperthermophilic Archaeon *Prococcus furiosus*: Cloning and overexpression in *Escherichia coli* of the gene, and its application to protein sequence analysis" *J. Biochem.* **1998**, *124*, 778-783.
- [317] Cummins, P. M.; O'Connor, B. "Pyroglutamyl Peptidase: an overview of the three known enzymatic forms" *Biochim. Biophys. Acta, Protein Struct. Mol. Enzymol.* **1998**, *1429*, 1-17.
- [318] Odagaki, Y.; Hayashi, A.; Okada, K., *et al.* "The crystal structure of Pyroglutamyl Peptidase I from *Bacillus amyloliquefaciens* reveals a new structure for a cysteine protease" *Structure* **1999**, *7*, 399-411.
- [319] Singleton, M. R.; Isupov, M. N.; Littlechild, J. A. "X-ray structure of Pyrrolidone Carboxyl Peptidase from the hyperthermophilic archaeon *Thermococcus litoralis*" *Structure with Folding & Design* **1999**, *7*, 237-244.
- [320] Ito, K.; Inoue, T.; Takahashi, T., *et al.* "The mechanism of substrate recognition of Pyroglutamyl-Peptidase I from *Bacillus amyloliquefaciens* as determined by X-ray crystallography and site-directed mutagenesis" *J. Biol. Chem.* **2001**, *276*, 18557-18562.
- [321] Edman, P. "A method for the determination of the amino acid sequence in peptides" *Arch. Biochem.* **1949**, *22*, 475-476.
- [322] Podell, D. N.; Abraham, G. N. "Technique for removal of pyroglutamic acid from amino terminus of proteins using calf liver Pyroglutamate Aminopeptidase" *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1978**, *81*, 176-185.
- [323] Mozdzanowski, J.; Bongers, J.; Anumula, K. "High-yield deblocking of amino termini of recombinant immunoglobulins with Pyroglutamate Aminopeptidase" *Anal. Biochem.* **1998**, *260*, 183-187.
- [324] Werner, W. E.; Wu, S.; Mulkerrin, M. "The removal of pyroglutamic acid from monoclonal antibodies without denaturation of the protein chains" *Anal. Biochem.* **2005**, *342*, 120-125.
- [325] Hellstrom, J. L.; Vehniainen, M.; Mustonen, M.; Lovgren, T.; Lamminmaki, U.; Hellman, J. "Unfolding of the immunoglobulin light and heavy chains is required for the enzymatic removal of N-terminal pyroglutamyl residues" *Biochim. Biophys. Acta, Proteins Proteomics* **2006**, *1764*, 1735-1740.
- [326] Bai, J. P. F. "pGlu-L-Dopa-Pro - A tripeptide prodrug targeting the intestinal peptide transporter for absorption and tissue enzymes for conversion" *Pharm. Res.* **1995**, *12*, 1101-1104.
- [327] Smal, M. A.; Dong, Z.; Cheung, H. T. A.; Asano, Y.; Escoffier, L.; Costello, M.; Tattersall, M. H. N. "Activation and cytotoxicity of 2- $\alpha$ -aminoacyl prodrugs of Methotrexate" *Biochem. Pharmacol.* **1995**, *49*, 567-574.
- [328] Ohkubo, A.; Seio, K.; Sekine, M. "A new strategy for the synthesis of oligodeoxynucleotides directed towards perfect *O*-selective internucleotidic bond formation without base protection" *Tetrahedron Lett.* **2004**, *45*, 363-366.
- [329] Ohkubo, A.; Kuwayama, Y.; Kudo, T.; Tsunoda, H.; Seio, K.; Sekine, M. "*O*-selective condensation using P-N bond cleavage in RNA synthesis without base protection" *Org. Lett.* **2008**, *10*, 2793-2796.
- [330] Ohkubo, A.; Sakamoto, K.; Miyata, K.; Taguchi, H.; Seio, K.; Sekine, M. "Convenient synthesis of *N*-unprotected deoxynucleoside 3'-phosphoramidite building blocks by selective deacylation of *N*-acylated species and their facile conversion to other *N*-functionalized derivatives" *Org. Lett.* **2005**, *7*, 5389-5392.

- [331] Yoshikawa, M.; Kato, T.; Takenishi, T. "A novel method for phosphorylation of nucleosides to 5'-nucleotides" *Tetrahedron Lett.* **1967**, 8, 5065-5068.
- [332] Ludwig, J.; Eckstein, F. "Rapid and efficient synthesis of nucleoside 5'- $\alpha$ -(1-thiotriphosphates), 5'-triphosphates and 2',3'-cyclophosphorothioates using 2-chloro-4H-1,3,2-benzodioxaphosphorin-4-one" *J. Org. Chem.* **1989**, 54, 631-35.
- [333] Burgess, K.; Cook, D. "Syntheses of nucleoside triphosphates" *Chem. Rev. (Washington, DC, U. S.)* **2000**, 100, 2047-2059.
- [334] Haas, J. "Synthese und Anwendung 2'-O-modifizierter universeller Nucleosidanaloga als RNA Inhibitoren" Dissertation, *Johann Wolfgang Goethe-Universität, Frankfurt am Main*, **2008**.
- [335] Haas, J.; Engels, J. W. "A convenient approach towards 2'-O-modified RNA-oligonucleotides on solid support using universal nucleosides" *Nucleic Acids Symp. Ser.* **2008**, 331-332.
- [336] Wada, T.; Ohkubo, A.; Mochizuki, A.; Sekine, M. "2-(Azidomethyl)benzoyl as a new protecting group in nucleosides" *Tetrahedron Lett.* **2001**, 42, 1069-1072.
- [337] Xu, J.; Guo, Z. "(2-Azidomethyl)phenylacetyl as a new, reductively cleavable protecting group for hydroxyl groups in carbohydrate synthesis" *Carbohydr. Res.* **2002**, 337, 87-91.
- [338] Horwitz, J. P.; Tomson, A. J.; Urbanski, J. A.; Chua, J. "Nucleosides. 1. 5'-Amino-5'-deoxyuridine and 5'-amino-5'-deoxythymidine" *J. Org. Chem.* **1962**, 27, 3045-3048.
- [339] Reist, E. J.; Goodman, L.; Benitez, A. "Synthesis of some 5'-thiopentofuranosylpyrimidines" *J. Org. Chem.* **1964**, 29, 554-558.
- [340] Mag, M.; Engels, J. W. "Synthesis and selective cleavage of oligodeoxyribonucleotides containing non-chiral internucleotide phosphoramidate linkages" *Nucleic Acids Res.* **1989**, 17, 5973-5988.
- [341] Bornstein, J.; Bedell, S. F.; Drummond, P. E.; Kosloski, C. L. "The synthesis of  $\alpha$ -amino-ortho-tolualdehyde diethylacetal and its attempted conversion to pseudoisindole" *J. Am. Chem. Soc.* **1956**, 78, 83-86.
- [342] Matsuda, H.; Hashimoto, N.; Okuno, T. "Novel preparation of (2-azidomethyl)benzoic acid and an application as a protective group" *Synth. Commun.* **2002**, 32, 3347-3355.
- [343] Liguori, A.; Perri, E.; Sindona, G.; Uccella, N. "Chemo and regioselective acylation of deoxyribonucleosides by means of *N,N*-bis-(2-oxo-oxazolidin-3-yl)phosphorodiammidic chloride (BOPDC)" *Tetrahedron* **1988**, 44, 229-234.
- [344] Pal, B.; Jaisankar, P.; Giri, V. S. "Versatile reagent for reduction of azides to amines" *Synth. Commun.* **2004**, 34, 1317-1323.
- [345] Higuchi, K.; Takei, R.; Kouko, T.; Kawasaki, T. "Total synthesis of marine bisindole alkaloid (+)-*cis*-Dihydrohamacanthin B" *Synthesis* **2007**, 669-674.
- [346] Hayakawa, Y.; Kataoka, M.; Noyori, R. "Benzimidazolium triflate as an efficient promoter for nucleotide synthesis via the phosphoramidite method" *J. Org. Chem.* **1996**, 61, 7996-7997.
- [347] Curtius, T. "Announcements from the chemical institute of the University of Heidelberg - 72. The effect of hydrazine hydrates on nitrocompounds" *J. Prakt. Chem.* **1907**, 76, 233-237.
- [348] Knapp, D. C.; D'Onofrio, J.; Engels, J. W. "Fluorescent labeling of (oligo)nucleotides by a new fluoride cleavable linker capable of versatile attachment modes" *Bioconjugate Chem.* **2010**, 21, 1043-1055.



- [349] Földesi, A.; Keller, A.; Stura, A.; Zigmantas, S.; Kwiatkowski, M.; Knapp, D.; Engels, J. W. "The fluoride cleavable 2-(cyanoethoxy)methyl (CEM) group as reversible 3'-O-terminator for DNA sequencing-by-synthesis - Synthesis, incorporation, and cleavage" *Nucleosides, Nucleotides Nucleic Acids* **2007**, *26*, 271-275.
- [350] Keller, A. C.; Serva, S.; Knapp, D. C.; Kwiatkowski, M.; Engels, J. W. "Synthesis of 3'-O-(2-cyanoethyl)-2'-deoxythymidine-5'-phosphate as a model compound for evaluation of cyanoethyl cleavage" *Collect. Czech. Chem. Commun.* **2009**, *74*, 515-534.
- [351] Matysiak, S.; Fitznar, H.-P.; Schnell, R.; Pfeleiderer, W. "Nucleosides. Part 63. Acetals as new 2'-O-protecting functions for the synthesis of oligoribonucleotides. Synthesis of uridine building blocks and evaluation of their relative acid stability" *Helv. Chim. Acta* **1998**, *81*, 1545-1566.
- [352] Ohgi, T.; Masutomi, Y.; Ishiyama, K.; Kitagawa, H.; Shiba, Y.; Yano, J. "A new RNA synthetic method with a 2'-O-(2-cyanoethoxymethyl) protecting group" *Org. Lett.* **2005**, *7*, 3477-3480.
- [353] Rensen, P. C. N.; van Leeuwen, S. H.; Sliedregt, L.; van Berkel, T. J. C.; Biessen, E. A. L. "Design and synthesis of novel N-acetylgalactosamine-terminated glycolipids for targeting of lipoproteins to the hepatic asialoglycoprotein receptor" *J. Med. Chem.* **2004**, *47*, 5798-5808.
- [354] Bi, L. R.; Kim, D. H.; Ju, J. Y. "Design and synthesis of a chemically cleavable fluorescent nucleotide, 3'-O-allyl-dGTP-allyl-bodipy-FL-510, as a reversible terminator for DNA sequencing by synthesis" *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128*, 2542-2543.
- [355] Hashmi, A. S. K.; Haufe, P.; Nass, A. R.; Bats, J. W. "The absolute configuration of the products of the enantioselective rhodium(I)BINAP-catalyzed enyne cyclization" *Adv. Synth. Catal.* **2004**, *346*, 421-424.
- [356] Soheili, A.; Albaneze-Walker, J.; Murry, J. A.; Dormer, P. G.; Hughes, D. L. "Efficient and general protocol for the copper-free Sonogashira coupling of aryl bromides at room temperature" *Org. Lett.* **2003**, *5*, 4191-4194.
- [357] Hobbs, F. W. "Palladium-catalyzed synthesis of alkynylamino nucleosides - A universal linker for nucleic-acids" *J. Org. Chem.* **1989**, *54*, 3420-3422.
- [358] Anderson, R. S.; Bollum, F. J.; Beattie, K. L. "Pyrophosphorolytic dismutation of oligodeoxynucleotides by terminal deoxynucleotidyltransferase" *Nucleic Acids Res.* **1999**, *27*, 3190-3196.
- [359] Armarego, W. L. F.; Perrin, D. D. "Purification of laboratory chemicals" Butterworth-Heinemann: Oxford, **2000**.
- [360] Davisson, V. J.; Davis, D. R.; Dixit, V. M.; Poulter, C. D. "Synthesis Of Nucleotide 5'-Diphosphates From 5'-O-Tosyl Nucleosides" *J. Org. Chem.* **1987**, *52*, 1794-1801.
- [361] Pitt, N.; Gani, D. "Synthesis and structure of a small macrocyclic hexapeptide model for antiparallel beta-sheet containing two restrained 2-(3'-aminopropynyl)-aniline reverse-turn mimetics" *Tetrahedron Lett.* **1999**, *40*, 3811-3814.
- [362] Aus dem <sup>1</sup>H-NMR Spektrum anhand der aromatischen Signale berechnet.
- [363] Shabanov, A. L.; Ismiev, I. I.; Magerramova, L. M.; Elchiev, A. B. "Macroheterocycles. Synthesis and cyclization of monoglycidyl ethers of glycols" *J. Org. Chem. USSR (Engl. Trans.)* **1987**, *23*, 251-254.

- [364] Kamal, A.; Khanna, G. B. R. "A facile preparation of (+/-)-beta-hydroxy nitriles and their enzymatic resolution with lipases" *Tetrahedron: Asymmetry* **2001**, *12*, 405-410.
- [365] Richey, H. G.; Moses, L. M.; Domalski, M. S.; Erickson, W. F.; Heyn, A. S. "Reactions of allylic Grignard-reagents and unsaturated amines" *J. Org. Chem.* **1981**, *46*, 3773-3780.
- [366] Yamashita, J.; Matsumoto, H.; Kobayashi, K.; Noguchi, K.; Yasumoto, M.; Ueda, T. "Studies on antitumor agents. 9. Synthesis of 3'-O-benzyl-2'-deoxy-5-trifluoromethyluridine" *Chem. Pharm. Bull.* **1989**, *37*, 2287-2292.
- [367] Sekine, M.; Fujii, M.; Nagai, H.; Hata, T. "An improved method for the synthesis of *N*<sup>3</sup>-benzoylthymidine" *Synthesis* **1987**, 1119-1121.
- [368] Die angegebene Ausbeute wurde aus dem <sup>1</sup>H-NMR Spektrum berechnet, da das Produkt nach der RP-HPLC Aufreinigung noch Reste von Triethylammoniumacetat enthielt.
- [369] Eckstein, F. "Oligonucleotides and analogues - a practical approach" IRL Press at Oxford University Press, Oxford, New York, Tokyo, **1991**.

# 9 Anhang

## 9.1 Publikationen, Poster und Vorträge

### Publikationen:

1. Foeldes, A.; Keller, A.; Stura, A.; Zigmantas, S.; Kwiatkowski, M.; Knapp, D.; Engels, J. W. „The fluoride cleavable 2-(Cyanoethoxy)methyl (CEM) group as reversible 3'-O-terminator for DNA Sequencing-by-Synthesis – Synthesis, incorporation and cleavage“ *Nucleosides, Nucleotides and Nucleic Acids* **2007**, 26, 3, 271-275.
2. Knapp, Diana Caterina; Engels, Joachim W.; Keller, Angelika; Li, Yangzhou; Gagilas, Julius; Serva, Saulius; Stura, Alina; Foldesi, Andras; Estmer Nilsson, Camilla; Kwiatkowski, Marek „Reversible Terminators for efficient Sequencing by Synthesis“ WO 2008037568.
3. Knapp, Diana C.; Keller, Angelika; D'Onofrio, Jennifer; Lubys, Arvydas; Serva, Saulius; Kurg, Ants; Remm, Mado; Kwiatkowski, Marek; Engels, Joachim „Synthesis of four colors fluorescently labeled 3'-O-blocked nucleotides with fluoride cleavable blocking group and linker for array based Sequencing-by-Synthesis applications“ *Nucleic Acids Symposium Series* **2008**, 52, 1, 345-346.
4. Keller, Angelika C.; Serva, Saulius; Knapp, Diana C.; Kwiatkowski, Marek; Engels, Joachim W. „Synthesis of 3'-O-(2-cyanoethyl)-2'-deoxythymidine-5'-phosphate as a model compound for evaluation of cyanoethyl cleavage“ *Collection of Czechoslovak Chemical Communications* **2009**, 74, 4, 515-534.
5. Diana C. Knapp, Jennifer D'Onofrio and Joachim W. Engels „Fluorescent labeling of (oligo)nucleotides by a new fluoride cleavable linker capable of versatile attachment modes“ *Bioconjugate Chemistry* **2010**, 21, 4, 1043-1055.

### Posterpräsentationen:

1. Diana Knapp, Angelika Keller, Saulius Serva, Sarunas Zigmantas, Andras Földesi, Marek Kwiatkowski, Joachim W. Engels „3'-Modified deoxyribonucleotides as reversible terminators for Sequencing-by-Synthesis“ *17<sup>th</sup> Int. Roundtable on Nucleosides, Nucleotides & Nucleic Acids*, Bern **2006**.
2. Jennifer D'Onofrio, Diana C. Knapp, Angelika Keller, Arvydas Lubys, Saulius Serva, Ants Kurg, Marek Kwiatkowski and Joachim W. Engels „Synthesis of fluoride cleavable, dye labeled reversible terminators for Sequencing-by-Synthesis“ *3. Nukleinsäurechemietreffen*, Stuttgart **2008**.

3. Diana C. Knapp, Angelika Keller, Jennifer D'Onofrio, Arvydas Lubys, Saulius Serva, Ants Kurg, Marek Kwiatkowski and Joachim W. Engels „Synthesis of fluoride cleavable, dye labeled reversible terminators for Sequencing-by-Synthesis“ *18<sup>th</sup> Int. Roundtable on Nucleosides, Nucleotides & Nucleic Acids and 35<sup>th</sup> Int. Symposium on Nucleic Acids Chemistry*, Kyoto **2008**.

**Vorträge:**

1. „Synthesis of 3'-O-CE modified, dye labeled dT and dA as reversible terminators for DNA Sequencing-by-Synthesis“ *4. EU-Projekttreffen* in Tartu, Estland **2007**.
2. „Synthesis of nucleotides with a fluoride cleavable linker“ *5. EU-Projekttreffen* in Frankfurt a. M., Deutschland **2007**.
3. „Alternative synthesis of dye labeled reversible terminators“ *6. EU-Projekttreffen* in Kopenhagen, Dänemark **2008**.

## 9.2 Lebenslauf

Name **Diana Caterina Knapp**

Geburtsdatum 02.09.1980

### Promotion

Johann Wolfgang Goethe-  
Universität Frankfurt a. M.  
Prof. Dr. J. W. Engels

März 2006 bis Juni 2010  
Promotion in organischer Chemie: *Entwicklung und  
Synthese spaltbarer Linker für den Einsatz in der DNA  
Sequenzierung und der Zellaufnahme von  
Oligonukleotiden.*

### Studium

Technische Universität Darmstadt Oktober 2000 bis September 2005  
Chemiestudium  
Abschluss als Diplom-Ingenieurin Chemie

Diplomarbeit  
Prof. Dr. M. Reggelin

März 2005 bis September 2005  
Diplomarbeit in organischer Chemie: *2,3-Disubstituierte  
 $\beta$ -Aminoaldehyde in der Synthese hochsubstituierter  
Aza(poly)cyclen über metallierte 2-Alkenylsulfoximine.*



### 9.3 Eidesstattliche Erklärung

Hiermit erkläre ich an Eides statt, dass ich die vorliegende Dissertation selbstständig und nur unter Zuhilfenahme der genannten Literatur und der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe.

Frankfurt am Main, den .....

.....

(Diana Caterina Knapp)